

Arzneistoff-Formulierung von Antisense-Oligonukleotiden gegen NMDA-Rezeptor-Expression

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Jörg Weyermann
aus Xanten

Frankfurt am Main, 2004
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. H. Schwalbe
1. Gutachter:	Prof. Dr. A. Zimmer
2. Gutachter:	Prof. Dr. D. Steinhilber
Datum der Disputatio:	14.12. 2004

Vorwort

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Andreas Zimmer für die Auswahl und Überlassung des Themas sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit. Trotz der großen räumlichen Entfernung war er immer ein Ansprechpartner für alle Probleme und hat mich oftmals an seinem Grazer Institut als Gast herzlich empfangen. Weiterhin möchte ich mich für das Korrekturlesen der zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten sehr bedanken.

Frau Prof. Jennifer B. Dressman und Herrn Prof. Jörg Kreuter gilt mein Dank für die Bereitstellung der instrumentellen Möglichkeiten und Räumlichkeiten am Institut für pharmazeutische Technologie. Herrn Prof. Bereiter-Hahn gebührt mein Dank, da er mir die Räumlichkeiten und Gerätschaften der zentralen Zellkultur am Institut für kinematische Zellforschung zur Verfügung gestellt hat.

Meine Anerkennung verdient Herr Heinz Schewe für seine Hilfestellung am konfokalen Laserscanmikroskop.

Diese Arbeit wurde finanziert im Rahmen des Graduiertenkollegs „Arzneimittel: Entwicklung und Analytik“ (GK 137/3) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Stellvertretend möchte ich dem Sprecher des Graduiertenkollegs Herrn Prof. Walter E. Müller und Frau Dr. Sieglinde Überall, der „guten Seele“ des Graduiertenkollegs, für diese Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für pharmazeutische Technologie der Universität Frankfurt, insbesondere Elisabeth („Sissy“) Herbert, Dr. Claus-Dieter Herzfeldt, Birgit Johann, Dr. Klaus Langer, Christine Maurer, Sylvia Niederdorf, Gisela Stöckel, Norman Storm und Marion Weiser danke ich für die praktische Unterstützung.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus unserer Arbeitskreis Christiane Georgens, Ingo Jennes, Dirk Lochmann, Anke Rohmann und Tanja Paukert, sowie den

Kolleginnen und Kollegen aus den benachbarten Arbeitskreisen und Instituten danke ich für das nette Arbeitsklima.

Hervorgehoben sei die ausgezeichnete Zusammenarbeit mit meinem Kollegen Dirk Lochmann, die zum wissenschaftlichen Erfolg beigetragen hat. Ebenso hervorgehoben sei der Spaß und die Freundschaft, die uns neben der Arbeit verbinden.

Der größte Dank gilt meinen Eltern für Ihre Unterstützung, Zuversicht und Ermunterung zum Studium und zur Anfertigung dieser Promotionsarbeit.

Zum Schluß möchte ich mich bei meiner Frau Astrid bedanken, die mir durch ihr Verständnis, ihre liebevolle Unterstützung und Geduld die nötige Kraft und Ausdauer zur Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Nukleinsäuren als Wirkstoffe.....	2
1.1.1	Aufbau der DNA.....	2
1.1.2	Biosynthese von Proteinen	4
1.1.3	Inhibierende Nukleinsäuren	4
1.1.3.1	Antisense-Oligonukleotide.....	4
1.1.3.2	Tripelhelix-Bildung.....	5
1.1.3.3	Katalytische RNA (Ribozyme).....	6
1.1.3.4	Aptamere	6
1.1.3.5	CpG-Motive	7
1.1.3.6	RNA-Interferenz (RNAi).....	8
1.1.4	Stabilität von Oligonukleotiden.....	9
1.1.5	Klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden.....	11
1.2	Arzneistoffträgersysteme für Antisense-Oligonukleotide	12
1.2.1	Liposomen.....	12
1.2.2	Nanopartikel	15
1.2.3	Protamin-Oligonukleotid-Partikel	17
1.2.4	Virale Hüllkapside	18
1.3	Zielprotein NMDA-Rezeptor	19
1.3.1	Struktur und Physiologie des NMDA-Rezeptors.....	20
1.3.2	Genetische Lokalisation	23
1.3.3	Krankheitsbilder des NMDA-Rezeptors	26
1.3.3.1	Ischämische Zustände	26
1.3.3.2	Neuropathischer Schmerz.....	27
1.3.3.3	Morbus Parkinson	27
1.3.3.4	Epilepsie	28
1.3.4	Apoptose und Nekrose	28
1.3.5	Zytotoxizitäts-Modelle für die Zellkultur	32
1.3.5.1	Laktatdehydrogenase (LDH)-Prüfung	32
1.3.5.2	MTT-Prüfung	33
1.3.5.3	Neutralrot-Prüfung.....	34
1.3.5.4	ATP-sensitive Biolumineszenz.....	34
1.4	Antisense-Sequenzen gegen NMDA-Rezeptorexpression	35
1.5	Ziel der Arbeit	38

2. Zusammenfassende Darstellung der veröffentlichten Originalarbeiten	40
2.1 Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2}	41
2.1.1 Eigenanteil	41
2.1.2 Zusammenfassung der Publikation.....	41
2.2 Comparison of cytotoxicity assays.....	43
2.2.1 Eigenanteil	43
2.2.2 Zusammenfassung der Publikation.....	43
2.3 New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent.....	46
2.3.1 Eigenanteil	46
2.3.2 Zusammenfassung der Publikation.....	46
2.4 Recombinant virus like particles as Drug Delivery System	48
2.4.1 Eigenanteil	48
2.4.2 Zusammenfassung der Publikation.....	48
2.5 Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy	50
2.5.1 Eigenanteil	50
2.5.2 Zusammenfassung der Publikation.....	51
2.6 Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles ..	53
2.6.1 Eigenanteil	53
2.6.2 Zusammenfassung der Publikation.....	53
2.7 Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation	55
2.7.1 Eigenanteil	55
2.7.2 Zusammenfassung der Publikation.....	55
2.8 Albumin-Protamine-Oligonucleotide-Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect.....	57
2.8.1 Eigenanteil	57
2.8.2 Zusammenfassung der Publikation.....	58
2.9 Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems	61
2.9.1 Eigenanteil	61
2.9.2 Zusammenfassung der Publikation.....	62

2.10	Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: preparation, physical properties and intracellular distribution	65
2.10.1	Eigenanteil	65
2.10.2	Zusammenfassung der Publikation	65
2.11	Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: protamine sulfate causes drastic size reduction	67
2.11.1	Eigenanteil	67
2.11.2	Zusammenfassung der Publikation	67
3.	Zusammenfassung	68
4.	Literaturverzeichnis	71
5.	Lebenslauf	83
Anhang	90

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscopy (Raster-Kraft-Mikroskopie)
AH-Chol	Cholest-5-en-3 β -yl 6-aminohexyl-ether
BSA	Bovines Serum-Albumin
CMV	Cytomegalie-Virus
DDS	Drug Delivery System
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat
DTAF	Dichlorotriazinamino Fluoreszein
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
HSA	Humanes Serum-Albumin
MMAEMA	Monomethylaminoethylmethacrylat
NMDA	n-Methyl-D-aspartat
NP	Nanopartikel
ODN	Phosphodiester
PBCA	Poly-butylcyanoacrylat
PEI	Poly-ethylenimin
PHCA	Poly-hexylcyanoacrylat
PLA	Poly-Milchsäure
PLGA	Poly-(lactic-co-glycolidsäure)
PLL	Poly-L-Lysin
PTO	Phosphorothioat
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Scanning Electron Microscopy (Raster-Elektronen-Mikroskopie)
TRITC	Tetramethylisothiocyanat
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

In den letzten Jahren sind Nukleinsäuren mehr und mehr in den Fokus des Interesses von Forschern auf der Suche nach neuen Wirkstoffen zur effektiven Behandlung von Krankheiten geraten. Die meisten Hoffnungen konzentrieren sich dabei auf die Gentherapie, bei der es sich um die Einschleusung von ganzen intakten Genen in die Zellen handelt, um einen Gendefekt auszugleichen. Ein anderer Ansatz, der bisher ein wenig im Schatten des Interesses gestanden hat, ist der Einsatz von kurzen Nukleinsäurefragmenten, den Oligonukleotiden, zur Inhibierung der Genexpression, d.h. der gezielten Hemmung der Bildung von Proteinen. Da es eine Vielzahl von Krankheiten gibt, die auf die eine oder andere Weise mit dem Vorhandensein von bestimmten krankheitsassoziierten Proteinen verknüpft sind, kann man hiermit gewisserweise Krankheiten behandeln, noch bevor sie entstehen. Die Zahl der möglichen Anwendungsgebiete ist hierbei nahezu unbegrenzt. Schwerpunkte bilden bisher jedoch virale Erkrankungen, wie CMV, Hepatitis und HIV, und die Krebstherapie.

Beide Prinzipien, Gentherapie und der Einsatz von inhibierenden Oligonukleotiden, basieren auf dem Transport von Nukleinsäuren über Membranbarrieren in die Zelle. Bei den meisten gentherapeutischen Ansätzen versucht man dies durch virale Trägersysteme zu bewältigen. Dahingegen setzt man bei dem Transport von Oligonukleotiden auf den Einsatz von liposomalen und nanopartikulären Trägersystemen.

Genexpression im Säugetiergehirn ist sehr kompliziert und schwer zu entschlüsseln. Der gezielte Einsatz von Oligonukleotiden, z.B. in Form der Antisensetechnik, bietet die Möglichkeit, die Vorgänge im Gehirn besser zu verstehen und hier regulierend einzugreifen. Bisher war es schwierig diese Technik einzusetzen, da es zum einen die bekannten Instabilitäten der Oligonukleotide zu bewältigen galt und zum anderen die Blut-Hirn-Schranke eine zusätzliche natürliche Barriere darstellt. Mit dem heutigen Fortschritt in der Entwicklung von nur noch wenig toxischen Strukturmodifikationen der Oligonukleotide und neuartigen Trägersystemen scheint jedoch auch hier ein therapeutischer Einsatz in greifbare Nähe gerückt zu sein.

1.1 Nukleinsäuren als Wirkstoffe

1.1.1 Aufbau der DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist der molekulare Träger der Erbinformation. Der Begriff beschreibt kein bestimmtes Molekül, sondern vielmehr eine Molekülart, die in den unterschiedlichsten Varianten im Kern und in den Organellen der einzelnen Zellen vorkommt.

Die monomeren Bausteine der DNA werden Desoxynukleotide genannt. Jeder dieser Bausteine besteht aus drei Komponenten, einer Purin- (Adenin oder Guanin) oder Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin) (Abb. 1), einer Desoxyribose und einem Phosphatrest.

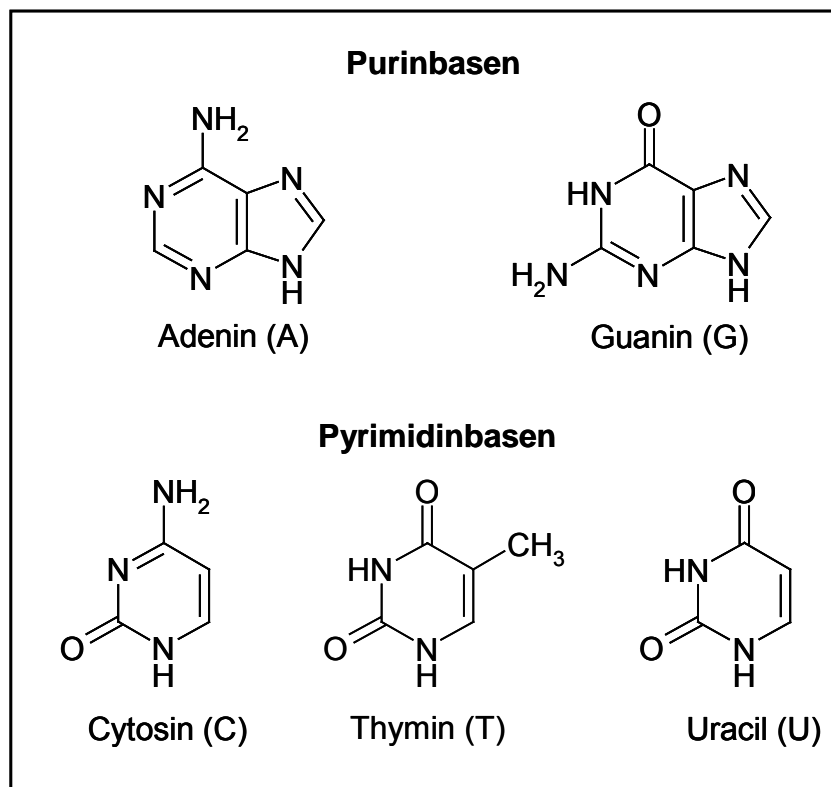


Abb. 1 Basenbausteine der DNA und RNA

Die Verknüpfung der Nukleotidbausteine erfolgt als Phosphodiesterbrücke über die 5'- und über die 3'-OH-Gruppen der Desoxyribose. Demzufolge hat jede Kette ein 5'- und ein 3'-Ende, wobei das 5'-Ende als Anfang und das 3'-Ende als das Ende der DNA bezeichnet werden. In einer weiteren codierenden Nukleinsäure, der RNA (Ribonukleinsäure), kommt anstelle von Desoxyribose Ribose als

Zuckerkomponente zum Einsatz. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass RNA kein Thymin, sondern Uracil, eine weitere Pyrimidinbase, enthält.

Nukleotide sind paarweise zueinander komplementär. Die komplementären Nukleotidpaare A/T (in DNA) bzw. A/U (in RNA) werden durch zwei Wasserstoffbrücken zwischen den Basen stabilisiert. Dagegen bildet das komplementäre Nukleotidpaar G/C drei Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aus, sodass diese Paarung etwas stabiler ist, als die zwischen A und T (siehe Abb. 2). Komplementäre Nukleinsäurestränge sind immer antiparallel zueinander angeordnet, d.h. am Ende eines Nukleinsäuredoppelstranges befindet sich das 5'-Ende des einen und das 3'-Ende des komplementären anderen Nukleinsäurestranges.

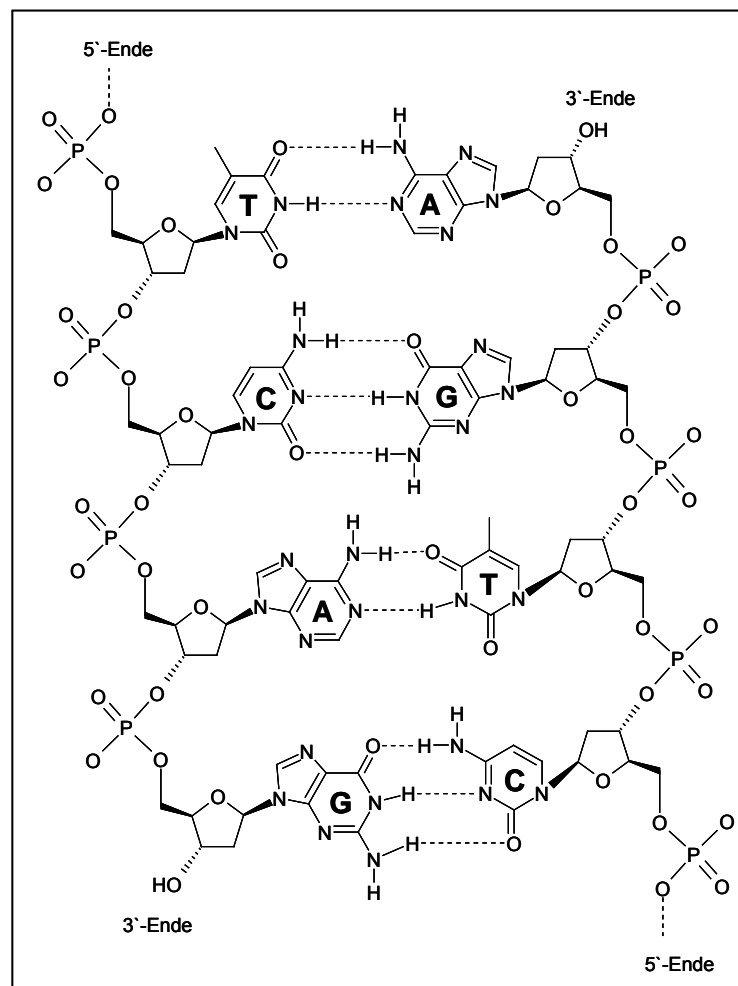


Abb. 2 Verknüpfung von Nukleotiden und Komplementarität von Nukleinsäuren modifiziert nach (Watson 1953)

1.1.2 Biosynthese von Proteinen

Alle Proteine werden von einzelnen Genen codiert. Diese befinden sich entweder im Zellkern oder in den Mitochondrien. Bei einem DNA-Doppelstrang, der ein Gen repräsentiert, unterscheiden wir den sogenannten codogenen oder Matrizen-Strang von dem nicht-codogenen Strang. Der erste Schritt der Biosynthese besteht im „Ablesen“ des codogen Strangs, der für das entsprechende Protein codierenden DNA. Das bei diesem Schritt entstehende Primärtranskript besteht aus RNA und hat eine zum codogenen Strang komplementäre Sequenz. Aus diesem Primärtranskript werden in einem Reifungsprozeß mittels Enzymen nicht codierende Stücke (Introns) herausgeschnitten. Der übriggebliebene Teil, der exprimiert werden soll, besteht aus den sogenannten Exons und wird als Messenger-RNA (m-RNA) bezeichnet. Die eigentliche Proteinsynthese erfolgt dann außerhalb des Zellkerns mit Hilfe von Transfer-RNA (t-RNA), die in der Translation die aus dem Zellkern ausgeschleuste m-RNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt, und den Ribosomen. Dabei codieren jeweils drei Basen (= Tripletts) ein Codon der m-RNA für eine Aminosäure. Zusätzlich gibt es noch ein Start-Codon (AUG), das den Anfang eines Proteins markiert, und drei Stopp-Codons (Berg 2003).

1.1.3 Inhibierende Nukleinsäuren

Inhibierende Nukleinsäuren sind kurze DNA- oder RNA-Sequenzen, die mit spezifischen Nukleinsäuresträngen interagieren und dadurch biologische Funktionsabläufe (Replikation, Transkription, RNA-Prozessierung, Translation und damit z.B. die Proteinbiosynthese) unterbinden oder zumindest hemmen können. Voraussetzung für eine solche Wirkung ist zum einen die Kenntnis der spezifischen Sequenz und zum anderen der Transport in die entsprechende Zelle.

1.1.3.1 Antisense-Oligonukleotide

Als Antisense-Nukleinsäure bezeichnen wir einen Nukleinsäurestrang, dessen Sequenz komplementär zu einer natürlich vorkommenden m-RNA ist. Da die m-RNA wiederum komplementär zum codogenen Strang der DNA ist, entspricht das Antisense-Oligonukleotid in seiner Sequenz dem codogenen Strang der DNA, der deshalb ebenfalls als Antisense-Strang bezeichnet wird. Die Funktion der

hemmenden Wirkung von Antisense-Strukturen auf die Proteinbiosynthese beruht darauf, dass sich die Einzelstränge der RNA und des Antisense-Oligonukleotids zu einem Doppelstrang zusammenlagern und dadurch das Ablesen des RNA-Strangs verhindert wird (Stephenson 1978; Zamecnik 1978). Mögliche Zielstrukturen für Antisense-Oligonukleotide sind funktionelle Bereiche des Primärtranskripts, wie die Capping-Region, die Polyadenylierungsstelle und Intron/Exon-Übergänge (Branch 1998). Eine Inhibierung der entsprechenden Prozesse verhindert eine effektive Ausschleusung aus dem Zellkern, eine ausreichende Stabilisierung der RNA bzw. die Entstehung voll-informativer RNA. Problematisch ist allerdings der Transport genügender Mengen des Antisense-Oligonukleotids in den Zellkern (Budker 1992). Leichter zugänglich sind daher Prozesse, die nicht mehr im Zellkern, sondern im Zytoplasma stattfinden, wie z.B. das Anbinden der Ribosomen an die RNA bzw. der Bereich um das erste AUG-Tripplet, dem Bereich, an dem die Translation gestartet wird.

Ein anderer Effekt ist, dass die RNA/DNA-Hybride Substrat für eine spezifische RNase (RNase H) darstellen, deren Bildung eben durch das Vorhandensein solcher Hybride noch induziert wird (Crooke 1999).

Rechnerisch kommt im Säugetiergenom von 3×10^9 Basenpaaren und einer Basenkomplexität von 4 eine Sequenz von 16 Nukleotiden nur einmal vor, d.h. dass eine Länge von 16-20 Basenpaaren eine ausreichende Spezifität aufweisen sollte. Die Stabilität komplementärer DNA-Stränge wird durch Mißpaarung geschwächt. Dabei ist der Grad der Schwächung abhängig von der relativen Position der Mißpaarung und von der Basenzusammensetzung im Hybrid. In einer A/T reichen Region schwächt eine Fehlpaarung die Stabilität des Hybrids stärker, als in einer G/C reichen (vgl. Abschnitt 2.1.). Liegt eine Fehlpaarung am Ende des Antisense-Oligos vor, ist die Schwächung ebenfalls größer als in der Mitte (Dingermann 1999).

1.1.3.2 Tripelhelix-Bildung

Bei den bisher erwähnten Methoden, die inhibierende Nukleinsäuren benutzen, war immer eine einzelsträngige RNA Zielstruktur. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit direkt die Ablesung der doppelsträngigen DNA zu hemmen (Minton 1985). Im Abschnitt 1.1. (Aufbau der DNA) wurde darauf hingewiesen, dass die DNA-Doppelhelix durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen die Basen

zusammengehalten wird (Watson/Crick-Basenpaarung). Theoretisch kann man jedoch auch noch einen dritten DNA-Strang über Wasserstoffbrücken (Hoogestein-Basenpaarung) einlagern und eine sogenannte Tripelhelix ausbilden. Allerdings geht dies nur zwischen Purinen in der DNA-Helix und Pyrimidinen. Um einen stabilen Komplex zu erhalten, sind daher Oligo-Purin oder Oligo-Pyrimidin-Sequenzen in der DNA erforderlich (Ferber 1997). Vorteil dieser Methode sollte sein, dass es wesentlich effizienter ist einmal die DNA-Ablesung zu blockieren, als sämtliche RNA-„Kopien“ dieser DNA abfangen zu wollen.

1.1.3.3 Katalytische RNA (Ribozyme)

Eine weitere inhibierende Nukleinsäure stellt die katalytisch-wirkende RNA dar. Die Entdeckung dieses Wirkungsmechanismus brachte den amerikanischen Forschern Cech und Altman 1989 den Nobelpreis ein. Ähnlich wie bei Proteinen wird durch Sequenzelemente eine Struktur stabilisiert, die ein aktives Zentrum schafft, in dem Phosphatesterhydrolyse katalysiert ablaufen kann, d.h. die RNA zerschneidet sich selbst in Stücke (Cech 1989). Als Katalysator fungieren bei der sogenannten Hammerhead-RNA ca. 40 Nukleotide, von denen einige konstant sein müssen, andere variabel sein können. Durch den konstanten Teil wird eine bestimmte Struktur vorgegeben, durch die eine katalytische Phosphatesterhydrolyse ermöglicht wird (Cech 1993). Durch die Wahl flankierender Sequenzen, die auch aus Desoxyribonukleotiden bestehen können, kann das Ribozym an jede beliebige RNA um ein 5'-GUC-3'-Trinukleotid dirigiert werden und könnte somit auch gezielt therapeutische eingesetzt werden, z.B. gegen Viruserkrankungen (Altman 1993).

1.1.3.4 Aptamere

Eine weitere Klasse von potentiell inhibierend wirkenden Nukleinsäuren stellen die Aptamere dar. Aptamere sind Moleküle, die nur indirekt aufgrund ihrer Nukleinsäuresequenz eine Wirkung erzielen, sondern in erster Line durch ihre Sekundärstruktur in der Lage sind Bindungstaschen auszubilden. Durch diese Bindungstaschen können Aptamere sehr selektiv mit niedermolekularen Molekülen, wie z.B. Theopyllin (Hermann 2000), aber auch mit komplexen Biomolekülen (Vuyisich 2002) wechselwirken. Dabei scheint RNA wegen der

zusätzlichen OH-Funktion an den Zuckern besser geeignet zu sein als DNA (Dingermann 1999). Die Schwierigkeit in der Findung der passenden Sequenz liegt darin, dass es bis heute nur bedingt möglich ist die entsprechenden dreidimensionalen Strukturen vorherzusagen. Daher geht man bei der Entwicklung so vor, dass man eine ganze Schar von DNA Fragmenten synthetisiert, die aus einem endständigen konstanten Bereich und einem stark permutierten Bereich in der Mitte bestehen. Der variable Teil soll die gewünschte Bindung zur Zielstruktur ausbilden und über diese Affinität eine Selektion ermöglichen. Die nicht-bindenden Fragmente werden aus dem Gemisch entfernt und die bindenden Aptamere mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR), die im bekannten konstanten Bereich startet, amplifiziert. Dieses Verfahren wird als SELEX-Verfahren (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) bezeichnet (Ellington 1990; Tuerk 1990). Leider benötigen die meisten Aptamere eine Kettenlänge von mindestens 30 bis 40 Nukleotiden für eine spezifische Bindung und sind daher in ihrer Anwendung limitiert (Osborne 1997).

1.1.3.5 CpG-Motive

Unterschiede im Aufbau von bakterieller oder viraler DNA (so genannte CpG-Motive) im Vergleich zur Wirbeltier-DNA ermöglichen dem Immunsystem, diese potenziellen Krankheitserreger aufgrund ihrer DNA-Struktur zu erkennen (Krieg 1995). CpG-Motive sind nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide mit bestimmten flankierenden Basensequenzen (Rothenfusser 2001). Synthetische Oligonukleotide, die solche CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren ein charakteristisches Aktivierungsmuster von Immunzellen (Hartmann 1998; Hartmann 2000). Kürzlich wurden ein potentes humanes CpG-Motiv identifiziert und nukleasestabile CpG-Oligonukleotide entwickelt. Die erste klinische Studie mit einem dieser Oligonukleotide hat die günstigen Eigenschaften von CpG-Oligonukleotiden als Vakzine-Adjuvans beim Menschen bestätigt. Derzeit werden CpG-Oligonukleotide zur Therapie von Tumorerkrankungen, Infektionserkrankungen, Allergien und Asthma bronchiale klinisch geprüft (Kerkmann 2003).

Immunstimulierende CpG-Oligonukleotide und Antisense-Oligonukleotide unterscheiden sich im Wesentlichen nicht in ihrer Sequenz, wirken aber über ein grundsätzlich verschiedenes biologisches Prinzip. In diesem Zusammenhang ist

bemerkenswert, dass die meisten Antisense-Oligonukleotide, die klinisch getestet wurden, unmethylierte und damit potenziell immunstimulierende CpG-Dinukleotide enthalten. Dazu gehören Fomivirsen (Handelsname Vitravene[®]), ein Antisense-Oligonukleotid, das 1998 in den USA und 1999 in Europa für die Therapie der Cytomegalie-Virus-Retinitis bei Patienten mit AIDS zugelassen wurde, ebenso wie das anti-bcl-2-Antisense-Oligonukleotid G3139, das derzeit in Kombination mit einer Chemotherapie bei verschiedenen Tumoren in Phase 3 geprüft wird.

1.1.3.6 RNA-Interferenz (RNAi)

Eine neuere Entwicklung in der Antisense-Technik ist die Verwendung von doppelsträngiger RNA. Wichtig bei diesem Ansatz ist, dass die eingeschleusten Ketten 21-25 Nukleotide lang sein müssen. Längere RNA-Stränge rufen in der Zelle eine unspezifische Antwort hervor, die letztendlich den gesamten Zellstoffwechsel lahmlegen kann und zum Absterben führt (Caplen 2001). Lediglich kurze Doppelstrang-RNA wird von diesem Abwehrmechanismus nicht erkannt und kann eine spezifische Reaktion gegen eine bestimmte m-RNA und damit gegen ein bestimmtes Protein auslösen. Diese speziellen RNA-Sequenzen von 21-25 Nukleotiden, die am 3'-Ende jeweils einen Überhang von 2 ungepaarten Nukleotiden haben, führen zu einem enzymatischen Abbau von m-RNA mit der gleichen Sequenz. Als Vehikel für die entsprechenden Oligonukleotide werden bisher meist kationische Liposomen verwendet (Elbashir 2001). Neuere Arbeiten kommen zu dem Ergebnis, dass die small interfering RNA (siRNA) in ihrer Effektivität der von „normalen“ Antisense-Oligonukleotiden, die aufgrund von RNase H-Aktivierung wirken, vergleichbar ist (Vickers 2003).

1.1.4 Stabilität von Oligonukleotiden

Eines der größten Probleme ist die Labilität von Nukleinsäuren. Sie müssen größtenteils parenteral und in hoher Konzentration (5-20 μ M) verabreicht werden, um in ausreichender Wirk-Konzentration ihr Ziel zu erreichen. Aus diesem Dilemma gibt es zwei Auswege:

1. Man versucht durch Modifikation die Stabilität und damit die inhibitorische Effizienz zu erhöhen (siehe Abb. 3).
2. Man versucht durch geeignete Drug-Delivery-Systeme (siehe Kapitel 1.2) einen Schutz vor Abbau zu bieten und die Bioverfügbarkeit zu verbessern.

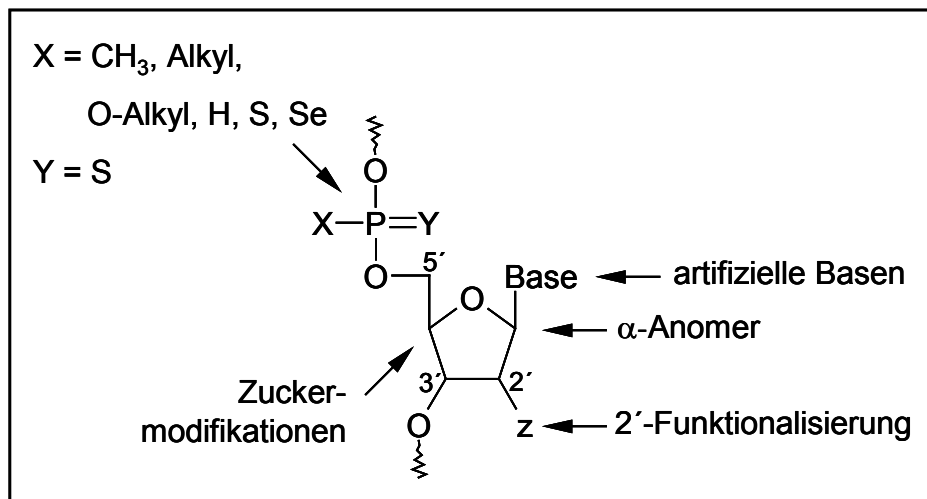


Abb. 3 Stabilisierung von Oligonukleotiden modifiziert nach (Dingermann 1999)

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten durch Modifikation der ODN eine Stabilisierung zu erreichen. Die Phosphatgruppe bietet sich an durch Verwendung von Methylphosphat, Thioat, Thiosulfat, Dithioat und Phosphoamidat, den enzymatischen Abbau zu hemmen. Die 2'-Position am Zucker kann z.B. alkyliert werden oder es können entsprechende Desoxyderivate verwendet werden. Auch die Verwendung von α -Anomeren oder modifizierten Basen kann ein Vorteil für die Stabilität bringen. Allerdings können solche Veränderungen auch dazu führen, dass erwünschte Reaktionen, wie der Abbau von RNA/DNA-Hybriden durch RNase H, nicht mehr erfolgen, weil das Enzym sein Substrat nicht mehr erkennt. Hierzu zählt die Verwendung von Methylphosphonaten, Phosphoamidaten und α -Anomeren

der Desoxyribose. Phosphate und Thiophosphate haben hingegen keinen Einfluß auf die RNase H-Aktivität und stellen so einen effektiven Schutz der Nukleotide vor Abbau durch Exonukleasen dar. Allerdings sind diese Änderungen im Molekül mit mehr oder weniger toxischen Effekten verbunden (Levin 1999). Gerade bei den Phosphorothiaten (PTO), der Oligionukleotidchemie der ersten Generation (siehe Abb. 4), stellt sich daher die Frage nach der Spezifität (Stein 1996). In neueren Studien (siehe Tab. 1) werden vermehrt 2'-O-methoxyethyl-Oligonukleotide (2'-MOE), die als Oligonukleotidchemie der zweiten Generation bezeichnet werden, eingesetzt, die eine der RNA ähnliche Struktur aufweisen und eine somit höhere Affinität erreichen.

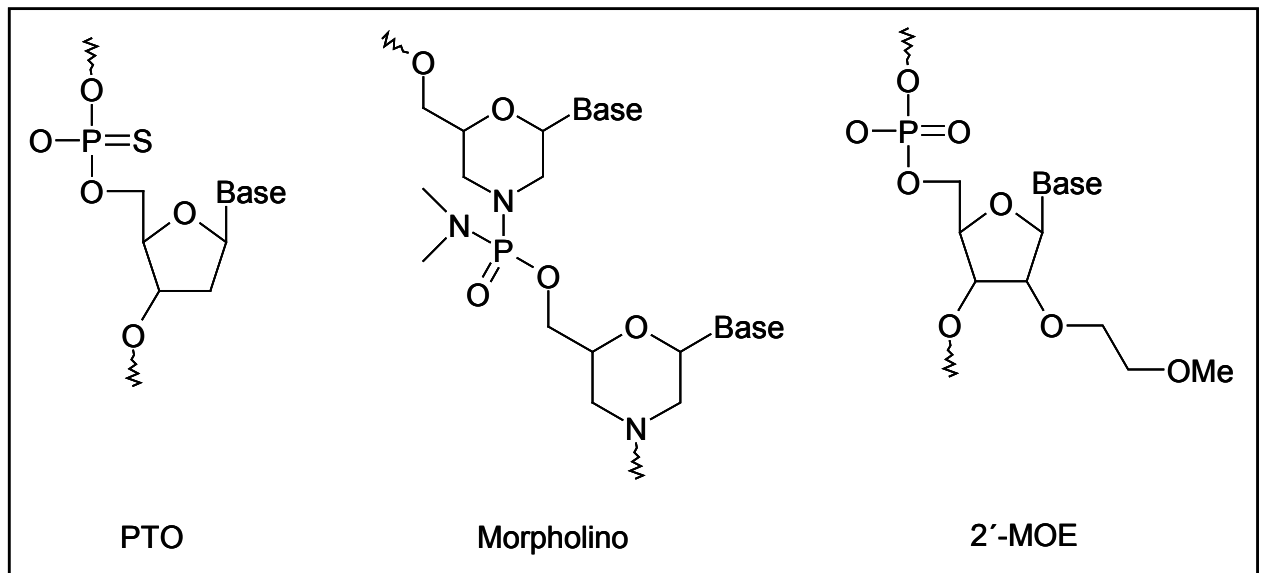


Abb. 4 Oligonukleotid-Modifikationen, die in klinischen Studien verwendet werden

1.1.5 Klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden

Zur Zeit befinden sich ca. 30 verschiedene Antisense-Wirkstoffe in der klinischen Prüfung. Vorreiterrolle spielt hier das Vitravene welches als erstes Präparat eine Zulassung zur Behandlung von Cytomegalie-Viren (CMV) erhalten hat. Die meisten Prüfpräparate sind gegen onkologische Erkrankungen gerichtet. Allerdings gibt es inzwischen auch eine Vielzahl von anderen Indikationen, wie z.B. der rheumatoide Formenkreis, Autoimmunerkrankungen, virale Infektionen und Herzkreislauf-erkrankungen (Lebedeva 2001; Dean 2003; Pirolo 2003). Die in den Studien verwendeten Oligonukleotide weisen meistens eine PTO-Modifikation auf. Neuere Studien setzen verstärkt 2'-MOE-Modifikationen (Kurreck 2003) bzw. Kombinationen aus DAN/RNA, die sogenannten Hybride ein. Die Verfügbarkeit von gut verträglichen Trägersystemen könnte in Zukunft den Einsatz von unmodifizierten Oligonukleotiden ermöglichen.

Tab. 1 Übersicht über den Stand der klinischen Forschung

Produkt	Target	Hauptindikation	Modifikation	Prälinik	Phase I	Phase II	Phase III	Markt	Sponsor
Vitravene	antiviral	CMV Retinitis	PTO	X	X	X	X	X	ISIS/Novartis
Affinitac	PKC-a	Lungen-CA (NSCLC)	PTO	X	X	X	X		ISIS/Lilly
Alicaforsen	ICAM-1	Morbus Crohn	PTO	X	X	X	X		ISIS
Alicaforsen	ICAM-1	Colitis ulcerosa	PTO	X	X	X	X		ISIS
Oblimersen	BCL-2	Malignes Melanom	PTO	X	X	X	X		Genta/Aventis
ProMune (CpG 7909)	TLR 9	Krebs	PTO	X	X	X	X		Coley
Alicaforsen	ICAM-1	Psoriasis	PTO	X	X	X			ISIS
Angiozyme	VEGF	Krebs	Ribozyme	X	X	X			Sirna Therapeutics
AP-12009	TGF-b	Glioblastome	PTO	X	X	X			Antisense Pharma
GEM 231	PKA 1	Krebs	Hybrid	X	X	X			Hybridon
GTI 2040	RNR	Nieren-CA	PTO	X	X	X			Lorus
GTI 2501	RNR	Krebs	PTO	X	X	X			Lorus
ISIS 104838	TNF-a	Rheumatoide Arthritis	2'MOE	X	X	X			ISIS
ISIS 104838	TNF-a	Psoriasis	2'MOE	X	X	X			ISIS
ISIS 113715	PTP-1B	Diabetes	2'MOE	X	X	X			ISIS
ISIS 14803	antiviral	Hepatitis C	PTO	X	X	X			ISIS
ISIS 2503	H-RAS	Pankreas-CA	PTO	X	X	X			ISIS
LErafAON	C-RAF	Krebs Radiosensitizer	PTO	X	X	X			NeoPharm
MG-98	DNA-MTF	Krebs	2'MOE	X	X	X			MethyGene
Oncomyc-NG	c-myc	Krebs	Morpholino	X	X	X			AVI BioPharma
GEM 92	GAG	HIV	Hybrid	X	X				Hybridon
MBI 1121	E1	human Papillomavirus	Hybrid	X	X				Hybridon
GEM 640/AEG 35156	XIAP	Krebs	Hybrid	X	X				Hybridon
ISIS 301012	ApoB-100	Cardiovascular	2'MOE	X	X				ISIS
OGX-011	Clusterin	Prostata-CA	2'MOE	X	X				ISIS/Oncogenix
GEM 220	VEGF	Krebs	Hybrid	X					Hybridon
GEM 240	mdm2	Krebs	Hybrid	X					Hybridon
ISIS 107248 (ATL 1102)	VLA-4	Multiple Sklerose	2'MOE	X					ISIS/ALT
ISIS 23722	Survivin	Krebs	2'MOE	X					ISIS/Lilly

Stand: April 2004

1.2 Arzneistoffträgersysteme für Antisense-Oligonukleotide

Problematisch bei der Nutzung von Antisense-Oligonukleotiden im Vergleich zu klassischen Arzneistoffen ist zum einen ihr schneller Abbau durch körpereigene DNasen und zum anderen ihre schlechte Bioverfügbarkeit für die Zellen. Ein möglicher Ansatz ist, die Struktur der Nukleotide zu verändern, um die Stabilität zu erhöhen (siehe Abschnitt 1.1.4). Ein anderer Ansatz ist der Einsatz von Arzneistoffträgersystemen (Drug-Delivery-Systemen), die sowohl vor enzymatischem Abbau schützen, als auch die Aufnahme in bestimmte Zellen erhöhen können. Bisher erprobte Trägersysteme sind:

- Liposomen
- Nanopartikel
- Protamin Oligonukleotid Partikel
- Virale Hüllkapside

1.2.1 Liposomen

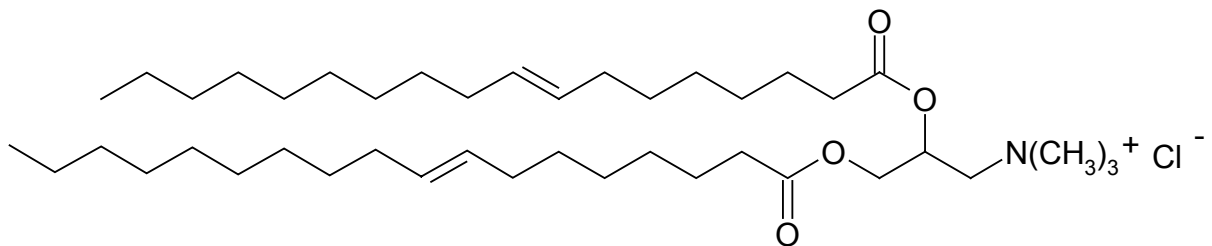
Liposomen (=Vesikel) sind Assoziate von amphiphilen Lipiden in Wasser. Liposomen besitzen konzentrisch angeordnete Doppelschichten (Bilayer) aus Phospholipiden (z.B. Eilecithin), die sich mit wäßrigen Zwischenschichten abwechseln. Je nach Anzahl der Schichten, d.h. in Abhängigkeit von der Größe, unterscheidet man zwischen small unilamellar vesicles (SUV, Durchmesser ca. 20 bis 50 nm), large unilamellar vesicles (LUV, Durchmesser >50 nm, multilamellar vesicles (MLV, Durchmesser über 400 nm) und large multilamellar vesicles (LMLV, Durchmesser ca. 0.1 bis 10 µm) (Burger 1998). Liposomen bieten den Vorteil, dass sie die DNA (RNA) vor Abbau schützen und dass DNA beliebiger Größe in Liposomen verpackt werden kann.

Unterschieden werden positiv-geladene (kationische Liposomen) und negativ-geladene (anionische Liposomen). Bei den kationischen Liposomen wird die negativ-geladene DNA mit den Lipiden gemischt und bildet mit ihnen einen stabilen Komplex aufgrund der gegensätzlichen Ladung. Bei der Bildung von anionischen Liposomen wird hingegen die DNA in das Innere der Liposomen aufgenommen. In beiden Fällen werden die Liposomen durch Endozytose von den Zellen aufgenommen und in einem endosomales Kompartiment separiert

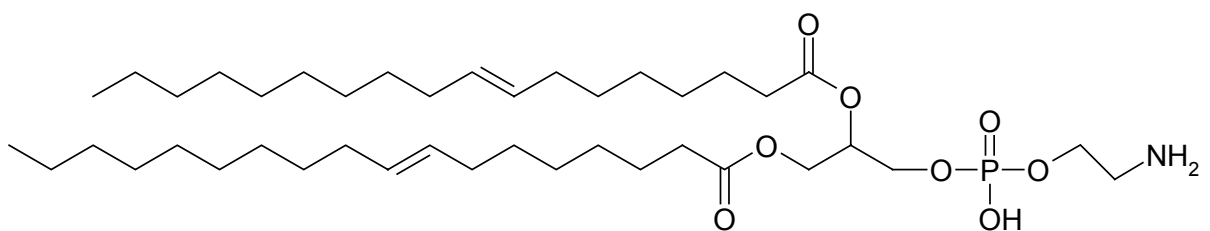
(Lebedeva 2000). Wie der Transport zum Zellkern funktioniert und ob die DNA auf ihrem Weg nicht schon durch Nukleasen degradiert wird, ist noch offen (Zelphati 1996).

Für Oligonukleotid-Transport am gebräuchlichsten sind die kationischen Lipide, die sich in drei Gruppen einteilen lassen (Hope 1998). Die erste Gruppe beinhaltet amphiphile Moleküle mit quartären Ammonium-Gruppen und langen mono-ungesättigten aliphatischen Ketten, die sich von Phospholipiden ableiten und meistens Ölsäurebestandteile enthalten. Beispiel hierfür ist DOTMA, der kationische Anteil des Transfektionsreagenzes Lipofectin®. Zusätzlich beinhaltet Lipofectin® ein ungeladenes Molekül (DOPE), welches zusätzlich die endosomale Zellmembran destabilisiert und dadurch die Freigabe der Oligonukleotide an den Wirkort Zytosol unterstützt (Lebedeva 2000).

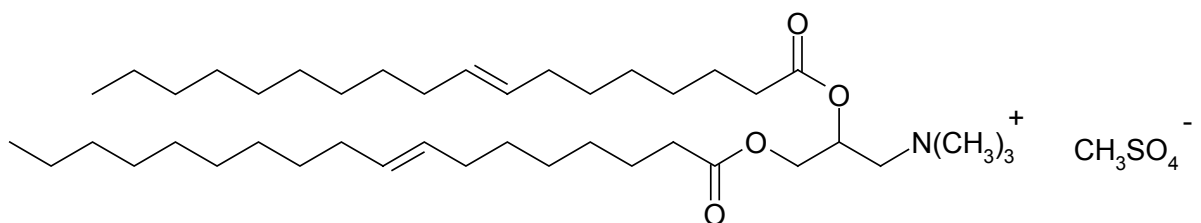
- DOTMA = N-[1-(2,3 dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid



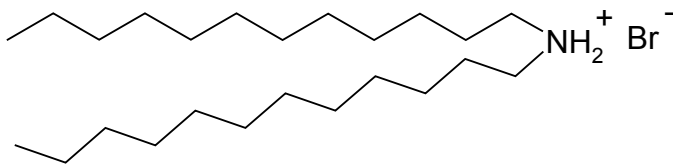
- DOPE = Dioleoylphosphatidylethanolamin



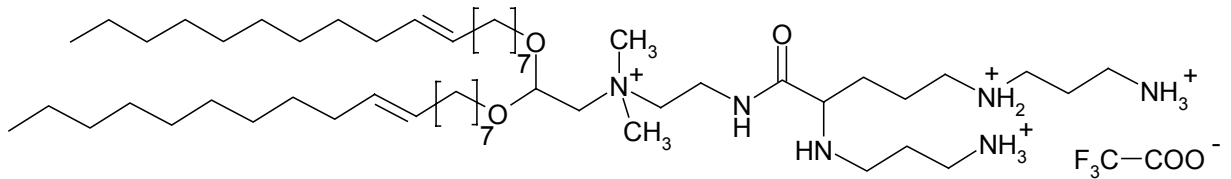
- DOTAP = N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat



- DDAB = Didodecyldimethylammoniumbromid

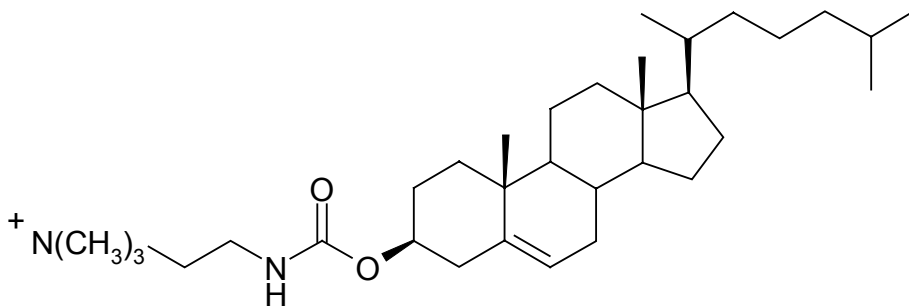


- DOSPA = 2,3-dioleyloxy-N[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetat

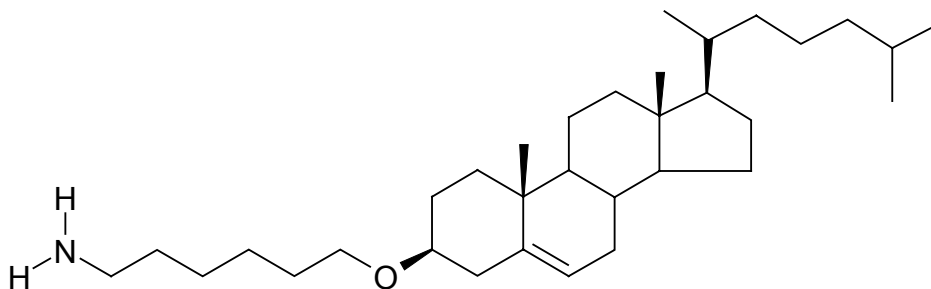


Die zweite Klasse wird aus kationisierte Cholesterol-Derivate gebildet, wie z.B. DC-Chol oder AH-Chol.

- DC-Chol = 3 β -(N-(N',N'-dimethylaminoethan)carbonyl)cholesterol

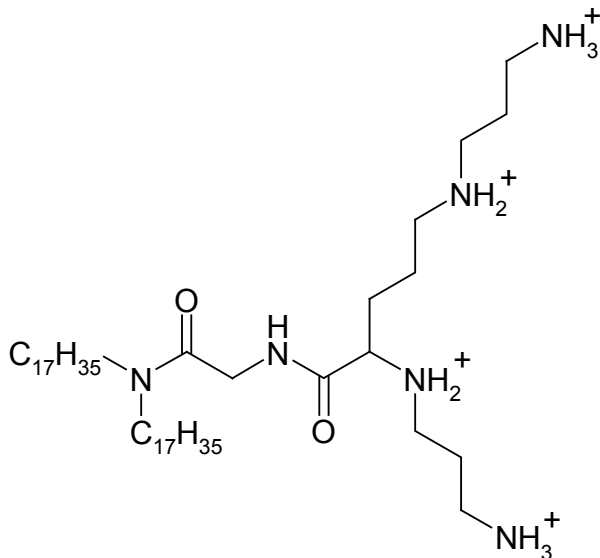


- AH-Chol = Cholest-5-en-3 β -yl-6-aminohexylether (Zimmer 1999)



Die dritte Klasse enthält Moleküle mit multivalenten Kopfgruppen (Lipopolyamine). Ein Beispiel hierfür ist DOGS, welches auch als Transfectam[®] erhältlich ist.

- DOGS = Dioctadecylamidoglycylspermin



Eine Vielzahl an chemischen Modifikationen an diesen Molekülen wurde vorgenommen, um eine pH-abhängige Oligonukleotid-Freigabe zu erhalten oder ein spezifisches Zelltargeting zu begünstigen. Dazu wurden spezifische Liganden an die Liposomen gebunden, welche eine spezifische Rezeptor-vermittelte Zellaufnahme ermöglichen (Zelphati 1993; Zhou 1994; Lebedeva 2000).

Neben der hohen Effektivität der kationischen liposomalen Oligonukleotid-Präparationen muss auch auf zwei grosse Nachteile dieser Technik hingewiesen werden. Kationische Liposomen besitzen ein hohes Maß an Zytotoxizität und verlieren ihre Transfektions-Effizienz in Anwesenheit von Serum-Proteinen (Zelphati 1998). Resultierend daraus sind kationische Liposomen in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug für *in vitro* Versuche geworden, konnten aber bisher nicht für eine klinische Anwendung eingesetzt werden (Zhang 1994).

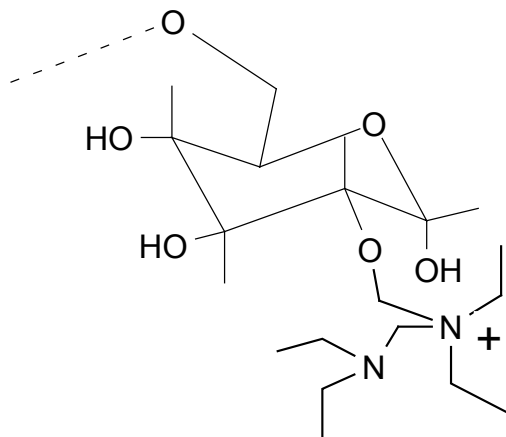
1.2.2 Nanopartikel

Nanopartikel sind ultrafeine, feste Partikel im kolloidalen Größenbereich zwischen etwa 10 nm und 300 nm (bis max. 1 µm) (Kreuter 1983) bestehend aus makromolekularen Materialien. Das können zum einen natürliche Polymere

beispielsweise Albumine (Langer 2003), Polysaccharide (Felt 1998) und Gelatine (Coester 2000) sein oder auch synthetische, gewebeverträgliche Kunststoffe wie Polyalkylacrylat, Polycyanoacrylat (Zobel 1997), Polyvinylpyrrolidon, Acrylpolymer, Polymilchsäure (Berton 2001) oder Polylaktide und deren Kondensate mit anderen Polyhydroxycarbonsäuren (Müller 1998).

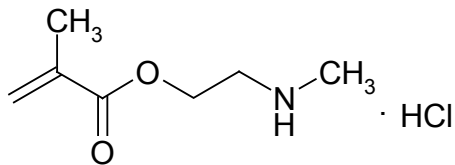
Für die Beladung mit Antisenseoligonukleotiden sind auch hier Strukturen mit einer positiven Ladung geeignet. Eine Möglichkeit zur Kationisierung der Nanopartikel bietet der Einbau von DEAE (Diethylaminoethyl)-Dextran in die Partikelmatrix (Bertling 1991; Zobel 1997).

- DEAE-Dextran



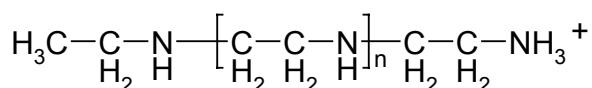
Als optimal in bezug auf Biokompatibilität und Trägerfunktion haben sich kationische Copolymer Nanopartikel mit 30% Methylamioethyl-methacrylat (MMAEMA) erwiesen (Zobel 2000).

- MMAEMA = N-monomethylamioethyl-methacrylat (Monomer)



Eine weitere Art des nicht-viralen Transfers von Nukleinsäuren ist die Bildung von synthetischen Polymeren mit Polyethylenimin (Godbey 1999).

- PEI = Poly(ethylenimin) (lineare Form)



1.2.3 Protamin-Oligonukleotid-Partikel

Bei den Protamin-Oligonukleotid-Partikeln, den sogenannten PrOtics, handelt es sich um Komplexe aus Oligonukleotiden und dem polykationischen Peptid Protamin, welches aus Fischsperma gewonnen wird und eine Molmasse zwischen 4000 und 4500 aufweist. Die positive Ladung des Protamins resultiert aus dem vermehrten Einbau der Aminosäure Arginin, welche sich über Ionenbindungen an die anionischen Oligonukleotide binden kann (siehe Abb. 5). PrOtics gewährleisten einen guten Schutz vor enzymatischem Abbau der Oligonukleotide und ermöglichen eine zelluläre Aufnahme bei geringer Zytotoxizität (Junghans 2000; Junghans 2001; Dinauer 2004).

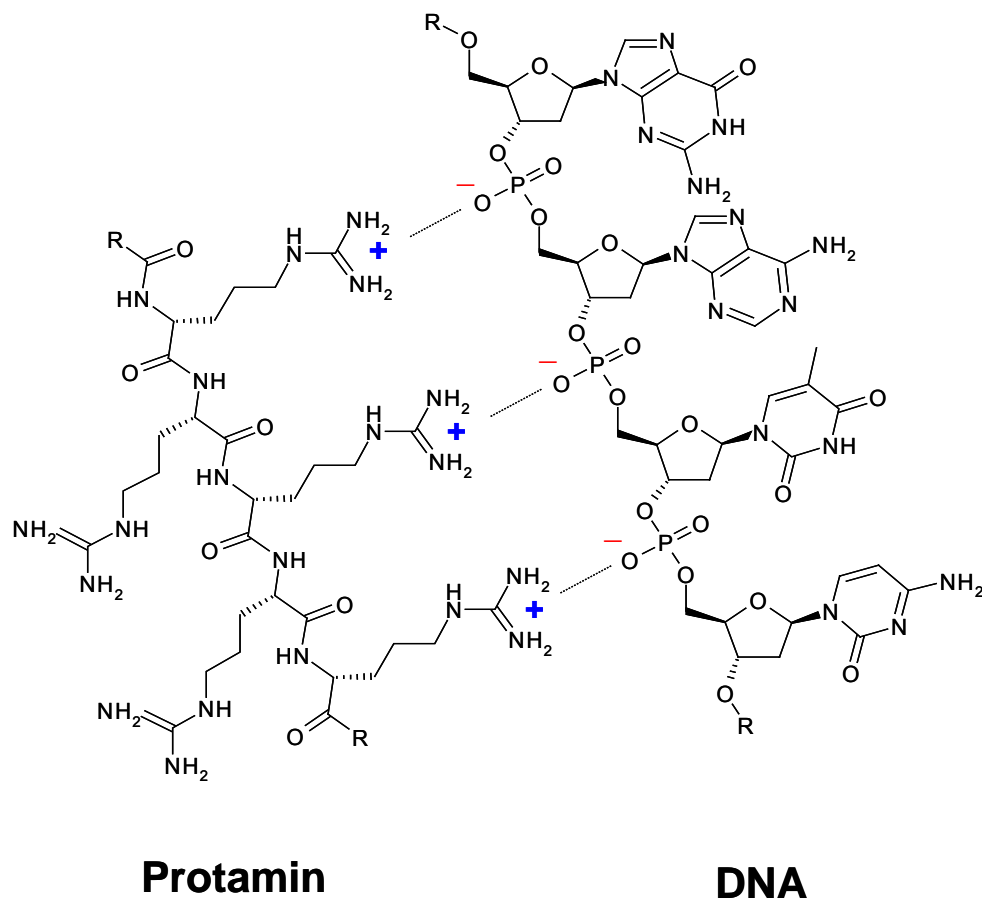


Abb. 5 Protamin-DNA-Komplexe

1.2.4 Virale Hüllkapside

Neben den oben beschriebenen nicht-viralen Drug-Delivery-Systemen für Oligonukleotide bietet es sich auch an, den „natürlichen Weg“ der Transfektion von Zellen mit „Fremd-DNA/RNA“ nachzuahmen. Eine Möglichkeit ist, leere Viruskapside mit den entsprechenden Oligonukleotiden zu beladen. Dazu bieten sich die Kapside des Polyomavirus an, die aus 72 Einheiten von jeweils fünf Proteineinheit (VP1) bestehen und rekombinant hergestellt werden können, als eine Art biotechnologischer Hilfsstoff. Da dieses Hüllprotein eine hohe Affinität zu Oberflächenrezeptoren der Targetzellen besitzt, ist eine zielgerichtete Aufnahme in die Zellen möglich (Braun 1999; Henke 2000).

1.3 Zielprotein NMDA-Rezeptor

Glutaminsäure (bzw. Glutamat) und Asparaginsäure sind die wichtigsten excitatorischen (erregenden) Neurotransmitter vom Aminosäuretyp im Zentralen Nervensystem (ZNS) und als solche bedeutsam für Lern- und Gedächtnisvorgänge, die Willkürmotorik sowie die Übertragung afferenter Impulse. Ihre Rezeptoren lassen sich als Glutamat-Rezeptoren oder als Exzitatorische-Aminosäuren-Rezeptoren bezeichnen, deren ligandgesteuerten Ionenkanäle werden nach ihren namensgebenden Repetitorliganden in die Subtypen NMDA- (=N-Methyl-D-Aspartat)-, AMPA- (=α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-propionsäure) und Kainat-Rezeptoren unterteilt (Abb. 6) (Mutschler 2001).

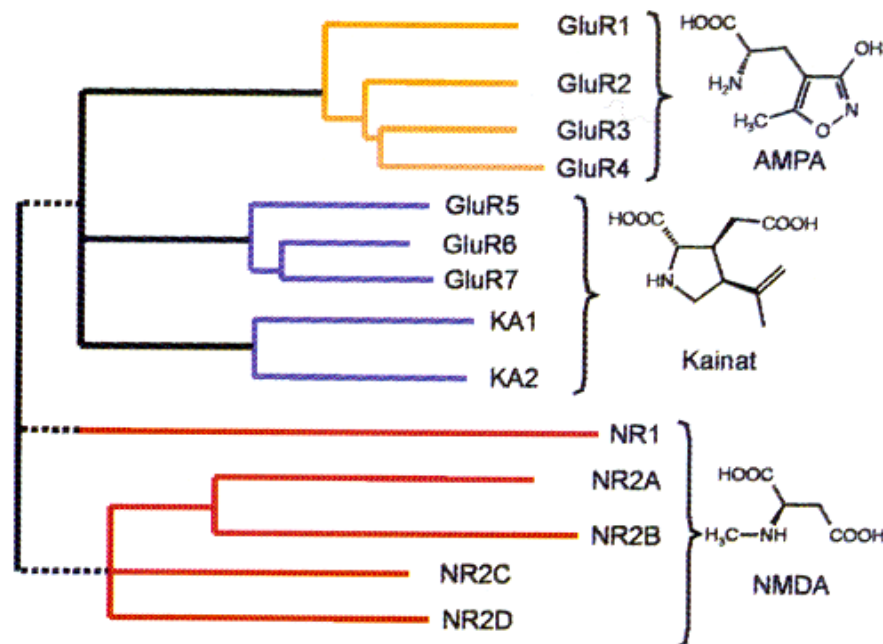


Abb. 6 Phylogenetischer Stammbaum der Glutamat-Rezeptoren, entnommen aus (Stark 2000a)

Angeichts der zentralen Rolle bei der Signalübertragung im ZNS und der Beteiligung an zahlreichen Krankheitsbildern einerseits und andererseits der relativ guten Möglichkeit der Modulation durch zwei bekannte kompetitive und zahlreiche allosterische Bindungsstellen, stellt der NMDA-Rezeptor ein interessantes Ziel sowohl für Antagonisten im klassischen Sinn, als auch für eine Hemmung der Expression durch Antisense-Oligonukleotide dar. Auch wenn die reduzierte NMDA-Rezeptorexpression in der vorliegenden Arbeit nur als Modell für eine

Antisensewirkung eingesetzt wurde, sollte man daher die eventuelle therapeutische Anwendung nicht aus den Augen verlieren (Estibeiro 2001).

1.3.1 Struktur und Physiologie des NMDA-Rezeptors

Das NMDA-Rezeptor-Protein bildet einen in Synapsen gelegenen ligandgesteuerten Ionenkanal, der im geöffneten Zustand durchlässig ist für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen. Bei normalem Ruhepotential ist er durch Magnesiumionen verschlossen (Nowak 1984) und kann erst nach Teildepolarisation, z.B. durch benachbart liegende AMPA-Rezeptoren, geöffnet werden (Abb. 7). Hierfür sind sowohl Glutaminsäure als auch Glycin als Ko-Agonist (Johnson 1987; Kleckner 1988) erforderlich (Abb. 8). Die nach Öffnung des Ionenkanals durch die subsynaptische Membran in die Nervenzelle zusammen mit Na^+ einströmenden Calciumionen erhöhen anhaltend die Effizienz der Erregungsübertragung. Diese sog. Langzeitpotenzierung (LPT; long-term potentiation) tritt jedoch nur ein, wenn gleichzeitig andere Synapsen an dem gleichen Neuron aktiviert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit für logische Verknüpfungen, wie sie für Lernvorgänge (Tang 1999) erforderlich sind.

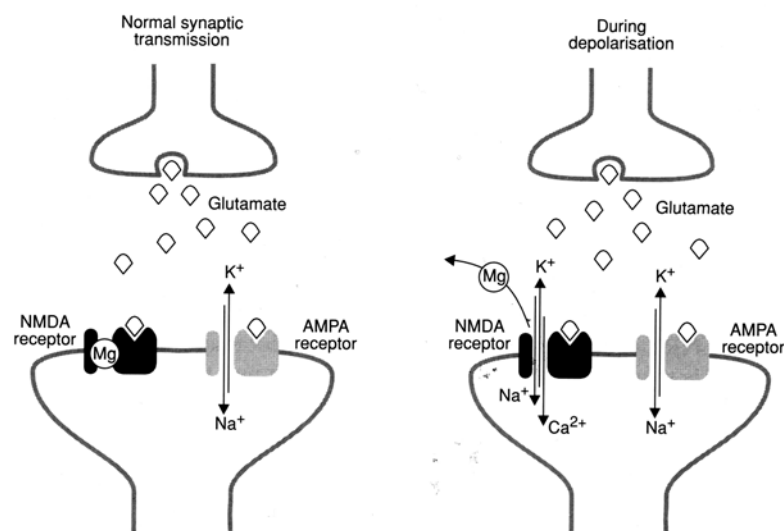
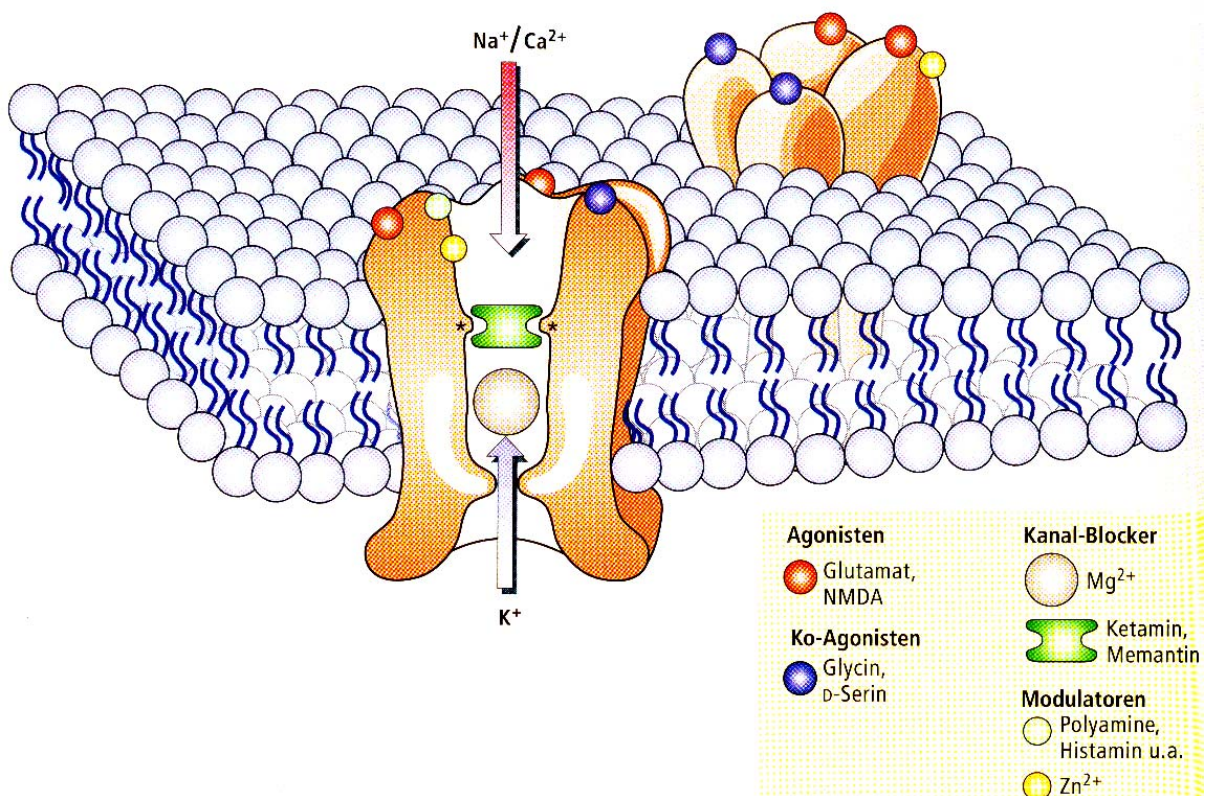


Abb. 7 Stimulation des NMDA-Rezeptors
entnommen aus (Ashcroft 2000)

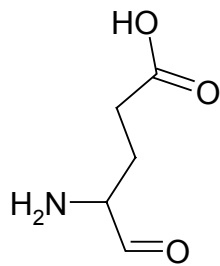


* Phencyclidin-Bindungsstelle (Offener-Kanal-Blocker)

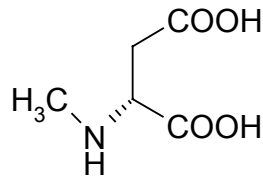
Abb. 8 Bindungsdomänen am NMDA-Rezeptor
modifiziert aus (Mutschler 2001)

Der NMDA-Rezeptor weist zahlreiche Bindungsstellen für verschiedenartige Verbindungen auf (Abb.8), die sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirkende Liganden aufnehmen können und so eine gezielte Beeinflussung ermöglichen.

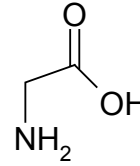
Kompetitive Liganden konkurrieren mit den natürlichen Liganden um die L-Glutamat- und Glycin-Bindungsstelle. Agonistische Wirkung haben neben L-Glutamat auch L-Aspartat und das namensgebende N-Methyl-D-aspartat (NMDA), welches zwar eine geringere Affinität besitzt, aber eine höhere Selektivität gegenüber Non-NMDA-Rezeptoren (AMPA- bzw. Kainat) aufweist.



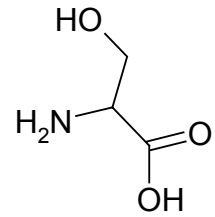
L-Glutaminsäure



NMDA

Agonisten


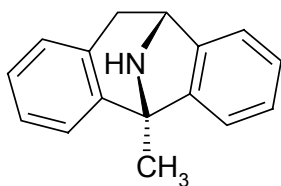
Glycin



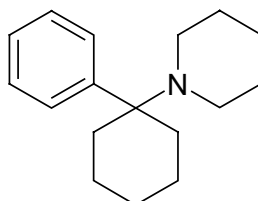
D-Serin

Ko-Agonisten

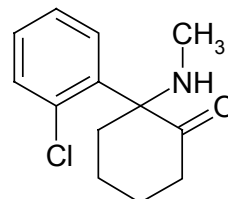
Verbindungen, die nicht an der selben Bindungsstelle, wie die natürlichen Liganden angreifen, sogenannte nicht-kompetitive Liganden, können den Rezeptor in verschiedenen Aktivitätszuständen angreifen. Die wichtigste Gruppe bilden die Offener-Kanal-Blocker, die im offenen Zustand in den Kanal eindringen und diesen quasi verstopfen. In diese Klasse von Antagonisten gehören Substanzen, wie z.B. MK-801 (Dizocilpin), Ketamin, Dextromethorphan oder das wegen seiner haluzinogenen Wirkung auch missbräuchlich verwendete Phencyclidin (PCP, „angel dust“). Aber auch Substanzen wie Amantadin und Memantin, die seit langem zur Parkinsontherapie eingesetzt werden, gehören zu den Offener-Kanal-Blockern (Stark 2000b).



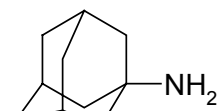
MK-801 (Dizocilpin)



Phencyclidin (PCP)



Ketamin



Amantadin

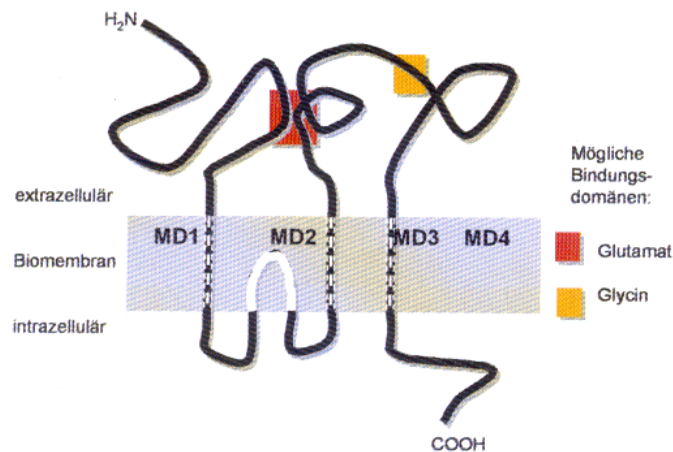


Abb. 9 Topographie der Rezeptoruntereinheiten,
(MD = membranäre Domäne) aus (Stark 2000a)

Der Aufbau aus sich in ihrer Topographie ähnelnden Untereinheiten ist allen glutaminergen Kationenkanäle gemeinsam (Abb. 9). Jede NMDA-Rezeptoreinheit besteht aus drei transmembranären Domänen (MD1, 3 und 4) und einer membranären Domäne (MD2), die nur in die Membran hineinragt, sie aber nicht durchdringt. Der N-Terminus des Proteins liegt extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär. Die vermutlichen Bindungsareale für die aktivierenden Aminosäuren (Abb. 8) befinden sich im extrazellulären Bereich und werden mutmaßlich über Zusammenlagerung verschiedener extrazellulärer Domänen gebildet (Stark 2000a).

1.3.2 Genetische Lokalisation

Die Lokalisation der für den NMDA-Rezeptor codierenden Sequenzen im Genom sind inzwischen von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht worden. Dabei hat sich gezeigt, dass es je nach Lage in den verschiedenen Hirnregionen Subtypen des NMDA-Rezeptor-Proteins exprimiert werden, die sich hinsichtlich ihrer molekularen Architektur und Funktion, sowie ihrem Entwicklungsstadium unterscheiden lassen.

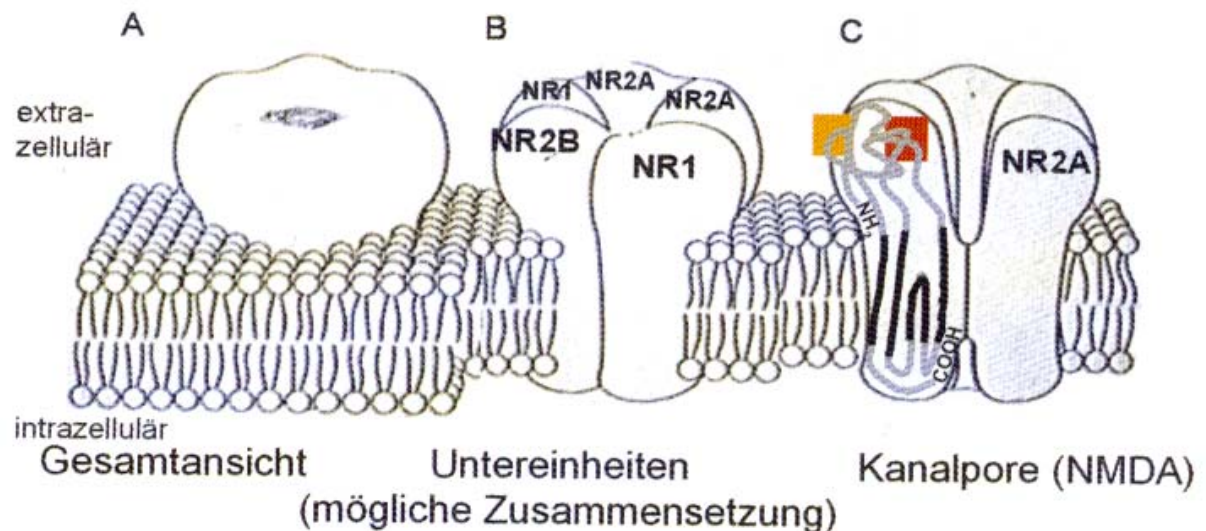


Abb. 10 Aufbau von NMDA-Rezeptoren: **A** Gesamtansicht; **B** mögliche Zusammensetzung der verschiedenen Untereinheiten; **C** Kanalpore mit Bindungsstellen (siehe Abb. 8), modifiziert nach (Stark 2000a)

Der Ionenkanal wird aus vier oder fünf Untereinheiten gebildet, der somit einen heteromultimeren Proteinkomplex darstellt. Früher ging man davon aus, dass der NMDA-Rezeptor, so wie die meisten ligandgesteuerten Ionenkanäle (z.B. serotoninerge 5-HT₃-, nicotinerge Acetylcholinrezeptoren etc.) aus fünf Untereinheiten aufgebaut ist (Abb. 10). Neuere Untersuchungen legen nahe, dass es sich in Analogie zu spannungsabhängigen Kaliumkanälen um Tetramere handelt (Rosenmund 1998). Es sind sowohl funktionsfähige NMDA-Rezeptoren aus zwei verschiedenen Untereinheiten (NR1 + NR2X), also auch drei Untereinheiten (NR1 + NR2X + NR2Y) bekannt. Dies erklärt auch die Tatsache, dass nur bei Koexpression von NR1 und NR2 in transfizierten Zellen funktionsfähige Ionenkanäle ausgebildet wurden (Steinmetz 2000). In jedem Fall ist die Expression von NR1-Proteinen essentiell.

Während die NR1-Untereinheiten ubiquitär im ZNS und im Rückenmark mit einer besonders hohen Dichte im Hippocampus und im Zerebralkortex verteilt sind, zeigen die NR2-Untereinheiten diskrete Verteilungen in spezifischen Hirnarealen. Die NR2A- und NR2B-Untereinheiten zeigen eine hohe Dichte im Cortex und Hippocampus von erwachsenen Säugetieren. Die NR2C-Untereinheiten sind bevorzugt im Kleinhirn (Cerebellum) und Rückenmark lokalisiert, während die NR2D-Untereinheiten im ZNS von Erwachsenen im Hirnstamm und Zwischenhirn (Diencephalon) verstärkt zu finden sind.

Tabelle 2: Rezeptorsubtypen in verschiedenen Säugetierspezies

Gen	Spezies	Anzahl der Aminosäuren	Molekulargewicht [kDa]	Referenz
NR1	Ratte	920	103	(Moriyoshi 1991)
	Maus ($\zeta 1$)	920		(Yamazaki 1992)
	Mensch	920		(Karp 1993); (Le Bourdelles 1994) ; (Planells-Cases 1993)
NR2A	Ratte	1442	163	(Monyer 1992)
	Maus ($\epsilon 1$)	1442		(Meguro 1992)
	Mensch	1464		(Hess 1996); (Le Bourdelles 1994)
NR2B	Ratte	1456	162	(Monyer 1992)
	Maus ($\epsilon 2$)	1456		(Kutsuwada 1992)
	Mensch	1484		(Adams 1995); (Hess 1996)
NR2C	Ratte	1218	134	(Monyer 1992)
	Maus ($\epsilon 3$)	1220		(Kutsuwada 1992)
	Mensch	1233		(Lin 1996)
NR2D	Ratte	1329	141	(Ishii 1993)
	Maus ($\epsilon 4$)	1296		(Ikeda 1992)
	Mensch	1336		(Hess 1998)
NR3A	Ratte	1115		(Sucher 1995)

Für den Menschen lassen sich folgende Rezeptorgene unterscheiden.

Tabelle 3: genetische Lokalisation

Protein	Chromosomale Localisation	Referenz
NR1	9q34.3	(Karp 1993)
NR2A	16p13	(Takano 1993)
NR2B	12p12	(Mandich 1994)
NR2C	17q25	(Takano 1993)
NR2D		(Ishii 1993)

Im Vergleich von Mensch zu anderen Säugetieren (wie z.B. Ratten) besteht eine hohe Homologität (ca. 99% beim NR1) bezüglich der Aminosäuresequenz, dennoch sollte bei der Suche nach geeigneten Antisense-Oligonukleotiden dieser Unterschied von 1% beachtet werden, um unnötige Fehlpaarungen zu vermeiden (siehe Abschnitt 1.1.2.1 „Antisense-Oligonukleotide“) (Karp 1993).

Zwischen den Untereinheiten vom Typ NR2A, NR2B und NR2C besteht eine Übereinstimmung in der Sequenz von 55-70%. Im Vergleich zum Typ NR1 liegt die Übereinstimmung noch bei knapp 20% (Monyer 1992).

1.3.3 Krankheitsbilder des NMDA-Rezeptors

Eine Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Schlaganfall, Schädelhirntrauma, Morbus Parkinson, Morbus Huntington, amyotrophe Lateralsklerose, Epilepsie, Schizophrenie und chronischer Schmerz, bilden potentielle Indikationen für Antagonisten des NMDA-Rezeptors, da ihre Pathogenese auf eine Übererregung des NMDA-Rezeptors und den damit verbundenen Zelluntergang durch Apoptose oder Nekrose zurückzuführen ist.

1.3.3.1 Ischämische Zustände

Unter Ischämie (griech. ischein = zurückhalten, hindern) versteht man die Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung eines Organs, Organteils oder Gewebes infolge mangelnder arterieller Blutzufuhr (z.B. durch Thrombose, Embolie, Endarteriitis obliterans, Gefäßspasmus, Tumoren) (Pschyrembel 1998). Die resultierende Sauerstoffarmut (Hypoxie) führt über eine vermehrte Glutamatfreisetzung zu einer Überaktivierung des NMDA-Rezeptors und einer erhöhten

intrazellulären Calciumkonzentration, die zum Absterben der Zelle führen kann (siehe 1.3.4 Apoptose und Nekrose). In diesem Fall kann die Gabe von NMDA-Rezeptorantagonisten einen neuroprotektiven Effekt haben und somit die Folgen von Schlaganfall, Schädelhirntrauma und anderen ischämischen Zuständen mit neurodegenerativer Verlaufsform mindern.

1.3.3.2 Neuropathischer Schmerz

Nervenschmerzen, auch als neuropathische Schmerzen oder Neuralgie bezeichnet, beruhen auf Irritation oder Schädigung peripherer Nerven oder zentralnervöser Strukturen, ohne Beteiligung von Nozizeptoren, wie z.B. Amputationsschmerzen, Trigeminusneuralgie, Schmerzen bei Engpaßsyndromen wie Karpaltunnelsyndrom oder Bandscheibenvorfall, Schmerzen bei Polyneuropathien (Diabetes mellitus), Schmerzen nach Rückenmarkverletzungen (Pschyrembel 1998).

Neuropathische Schmerzen und allgemein der Vorgang der Chronifizierung von Schmerzen scheint mit einem Anpassungsvorgang der Synapsen zu tun zu haben. Es wird spekuliert, dass plastische Veränderungen bei der anregenden synaptischen Transmission zwischen bestimmten Zellen der Entzündungsübertragung (C-Fasern) und Schmerzfasern (dorsale Nozizeptoren) im Hippocampus des Gehirns zu einer Speicherung der Schmerzerinnerung führen. Diese Schmerzerinnerung kann leicht wieder abgerufen werden und führt zu einem neuropathischen Schmerz, der sich rasch steigern kann. Dieser Prozeß des Aufschaukelns kann durch NMDA-Rezeptorantagonisten unterbrochen werden (Williams 1999).

1.3.3.3 Morbus Parkinson

Beim Morbus Parkinson handelt es sich um eine vom Londoner Arzt Parkinson 1817 erstmals beschriebene Erkrankung des extrapyramidalen Systems, bei der es durch das Absterben von dopaminergen Nervenzellen in den motorischen Kernen des Stammhirns zur Reduktion oder zum Ausfall der dopaminergen Hemmung und damit zum Überwiegen des cholinergen Systems kommt (Pschyrembel 1998).

Nach der „Glutamat-Hypothese“ entstehen reaktive Dopaminmetabolite bzw. andere toxische Abbauprodukte, die einen neurotoxischen Effekt durch Oxidation von Zellbestandteilen, vor allem Glutamattransporter und NMDA-Rezeptoren, zeigen. Die Folge ist, dass durch den gestörten Abtransport von Glutamat, dessen Konzentration und damit auch die Innervation der intakten NMDA-Rezeptoren steigt, was wiederum zum Absterben der Zelle führen kann. Ähnlich der neuroprotektiven Wirkung bei ischämische Zuständen (s.o.) kann auch hier eine Hemmung der Rezeptoraktivität einen positiven Effekt hervorrufen (Stark 2000b).

1.3.3.4 Epilepsie

Epilepsie oder Fallsucht ist eine chronische zerebrale Funktionsstörung, die durch sich wiederholende epileptische Anfälle charakterisiert ist (Gastaut 1976). Beim Epileptischer Anfall handelt es sich um eine plötzlich einsetzende Funktionsstörung des Gehirns, der eine Entladung der Neuronen mit exzessiv gesteigerter Frequenz und abnormer Synchronie zugrunde liegt (Pschyrembel 1998).

Mit NMDA-Rezeptorantagonisten konnte eine antikonvulsive Wirkung gezeigt werden. Allerdings haben kompetitive Glutamat-Antagonisten (D-CPP-ene) eine Reihe dosisabhängiger Nebenwirkungen gezeigt, wie z.B. Konzentrationsschwäche, Sedierung, Depression, Ataxie und Amnesie. Demgegenüber haben Antagonisten an der Glycin-Bindungsstelle ein günstigeres Nebenwirkungsprofil und stellen einen vielversprechenden Therapieansatz dar (Steinmetz 2000).

1.3.4 Apoptose und Nekrose

Unter Apoptose versteht man den sogenannten programmierten Zelltod, d.h. einen Zelluntergang, der durch genetische Information der betroffenen Zelle selbst reguliert wird. Apoptose ist die Grundlage einer geregelten Embryogenese (Absterben überflüssiger Organanlagen), Gewebemöostase (Schutz vor Neubildungen → Krebs) und Funktion des Immunsystems (Auslösen von Apoptose bei Zielzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten). Dieser Vorgang kann z.B. durch Rezeptorbindung oder Enzymwirkung (Protease) ausgelöst werden und spielt wahrscheinlich eine Rolle bei Zytostatikawirkung, Strahlentherapie und

anderen Therapieprinzipien. Im Gegensatz dazu beschreibt der Begriff Nekrose den Untergang von Zellen durch direkten äußeren Einfluß z.B. durch extreme Abweichungen von physiologischen Bedingungen besonders durch Unterkühlung (Hypothermie) oder Hypoxie. In den meisten Fällen ist Nekrose auf einen Schaden der Plasmamembran zurückzuführen, der zu einem Verlust von extrazellulären Ionen und dem Einstromen von Wasser führt. Durch diese Vorgänge wird die Homöostase der Zelle gestört und im schlimmsten Fall kann es zum Platzen (Zellyse) kommen (Steinmetz 2000).

Im Zusammenhang mit der durch Glutamat ausgelösten Zellschädigung durch massiven Ca^{2+} -Einstrom findet man auch noch den Begriff Exzitotoxizität, der sich aus Exzitation (Erregung) und Toxizität bildet (Stark 2000a).

Die Abfolge der Reaktionen der Zelle nach Ausschüttung von Glutamat können wie folgt beschrieben werden (siehe auch Abb. 11):

Durch die Erregung von AMPA-Rezeptoren kommt es zu einer schnellen Depolarisation der postsynaptischen Membran und in der Folge zu einer Aufhebung der spannungsabhängigen Blockade des NMDA-Ionenkanals durch Magnesiumionen. In Gegenwart von physiologischen Konzentrationen an Glycin wird die schnelle Desensitivierung der NMDA-Rezeptoren inhibiert. Dies führt zu einer ausgeprägten Aktivierung dieser Rezeptoren mit der Folge eines massiven Einstroms von Calcium- und Natriumionen. Als Folge des verstärkten Na^{+} -Einstroms werden schnelle spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle geöffnet (vgl. Abschnitt 1.1 Physiologie). Dabei bewirkt möglicherweise die zusätzliche Aktivierung langsamer metabotroper Glutamatrezeptoren (mGlu) eine weitere Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über die Aktivierung der Phospholipase C-Kaskade, die schließlich dazu führt, dass aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) Ca^{2+} ins Cytosol freigegeben wird.

Die dramatische Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zum Auslösen einer Vielzahl von Signalkaskaden. Über verschiedene Faktoren werden Calmodulin und andere Ca^{2+} -abhängige Enzyme, sowie Proteasen, Lipasen und weitere cytotoxische Enzyme, aktiviert. Dem Einstrom von Kationen folgt ein passiver Einstrom von Chlorid-Ionen und eine Erhöhung des osmotischen Drucks bis hin zur osmotischen Lyse der Plasmamembran. Neben einer Schädigung des Cytoskeletts erfolgt ein rascher Abfall der Adenosintriphosphat-(ATP-)Spiegel durch Schädigung der Ca^{2+} -speichernden Mitochondrien. Je nach Ausmaß dieser

Schädigung kommt es in Abhängigkeit der zellulären ATP-Spiegel zu raschen nekrotischen Veränderungen oder zeitlich verzögert zur Apoptose, dem Zelluntergang (Stark 2000a).

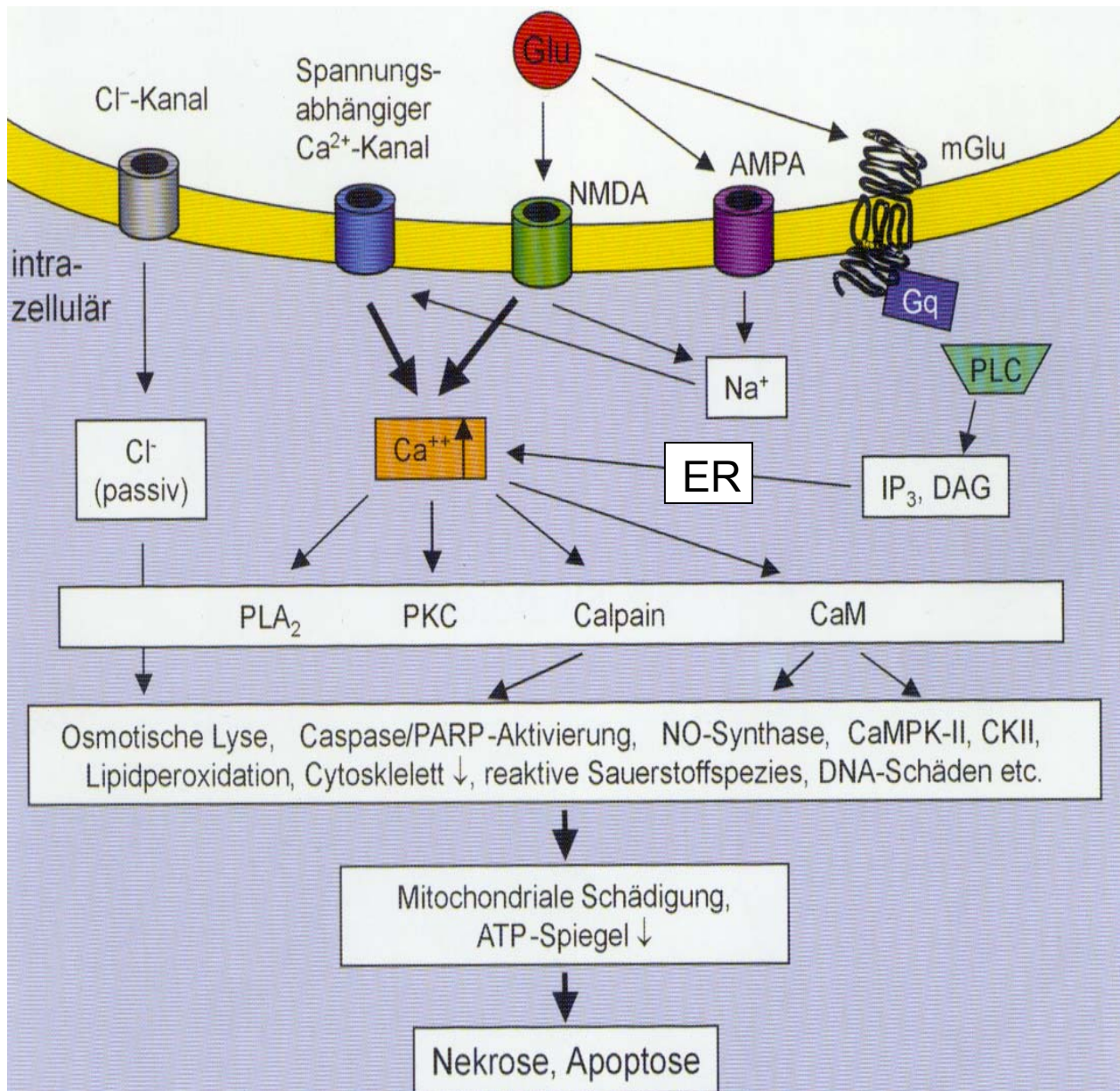


Abb. 11 Glutamat-(GLU-) vermittelte Exzitotoxizität

(Gq = Guanylnukleotidbindendes Protein_q; PLC = Phospholipase C; IP_3 = 1,4,5-Inositoltriphosphat; DAG = Diacylglycerol; ER = Endoplasmatisches Retikulum; PLA_2 = Phospholipase A₂; PKC = Proteinkinase C; CaM = Calmodulin; PARP = Poly(ADP-Ribose)-Polymerase; CaMPK-II = Calmodulin-abhängige Proteinkinase II; CKII = Caseinkinase II; ATP = Adenosintriphosphat)
modifiziert nach (Stark 2000a)

1.3.5 Zytotoxizitäts-Modelle für die Zellkultur

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten Zytotoxizität oder Zelltod, aus nekrotischen oder apoptotischen Vorgängen, zu bestimmen. Angetrieben durch die Bestrebungen zur Miniaturisierung von Toxizitätsprüfungen im Zellkulturmaßstab sind in den letzten Jahren einige neue Methoden entwickelt worden, die geeignet sind Absterbe- und Proliferationsuntersuchungen durchzuführen (Cook 1989). Die meisten modernen gebräuchlichen Methoden sind für den Gebrauch von Multititerplatten im 96-well-Format optimiert worden. Die Nutzung von Multititerplatten erlaubt die schnelle und gleichzeitige Auswertung von vielen Proben in entsprechend automatisierten Plattenlesegeräten, z.B. ELISA-reader, die Absorption oder Lichtemission messen können.

1.3.5.1 Laktatdehydrogenase (LDH)-Prüfung

Die Integrität der Zellmembran ist ein Parameter für den Zelltod und kann gemessen werden über das Vorhandensein von normalerweise nur zytosolisch (d.h. im Zellinneren) vorkommenden Enzymen im Zellmedium. Die Laktatdehydrogenase ist ein solches Enzym, das in allen Zellen vorkommt. Ist die Zellmembran beschädigt, tritt es schnell aus der Zelle aus und ist im Überstand nachzuweisen (Korzeniewski 1983). Die LDH-Aktivität wird über eine zweistufige Enzymreaktion bestimmt an deren Ende ein farbiges Formazan entsteht (Abb. 12) (Nachlas 1960; Decker 1988; Lappalainen 1994).

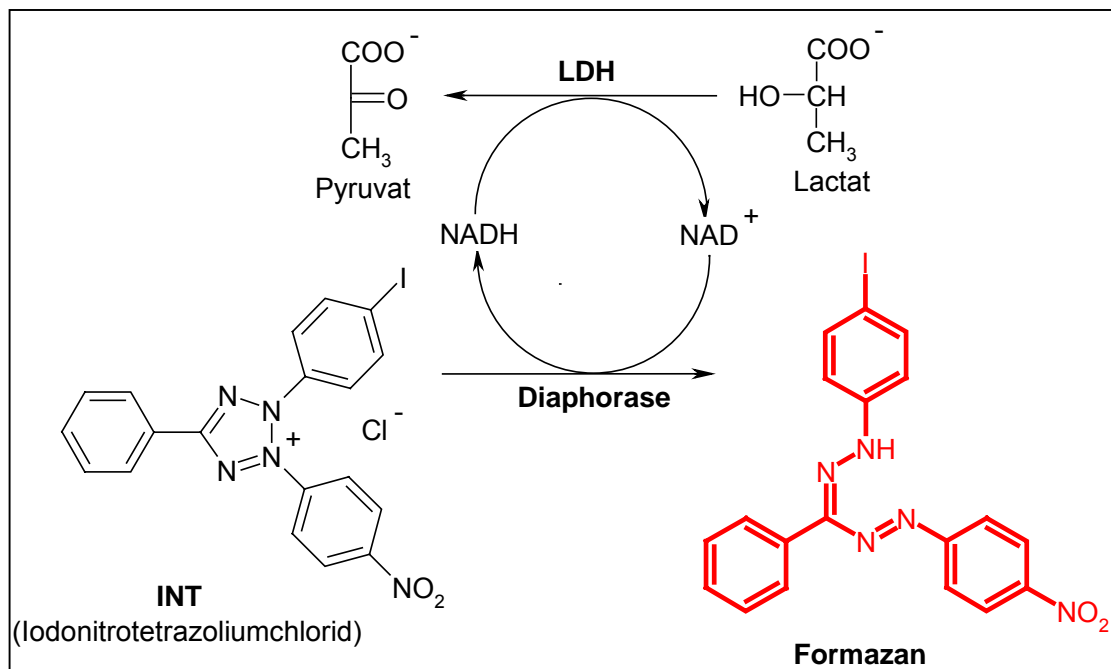


Abb. 12 Reaktionsverlauf bei der LDH-Bestimmung

1.3.5.2 MTT-Prüfung

Ein anderer Parameter, der zur Bestimmung der Vitalität von Zellen herangezogen wird, ist der Umsatz von bestimmten Tetrazoliumsalzen zu farbigen Formazanen (Smith 1951). Die Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau gefärbten Formazan läuft nur in metabolisch aktiven Zellen ab, deren Mitochondrien noch weitgehend funktionstüchtig sind (Abb. 13) (Mosmann 1983).

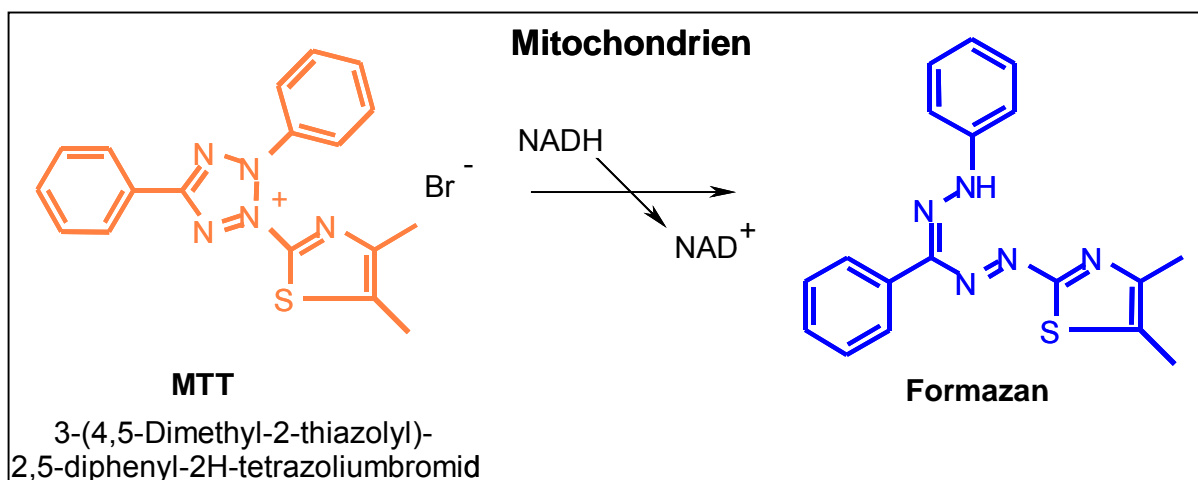


Abb. 13 Reaktionsverlauf bei der MTT-Prüfung

1.3.5.3 Neutralrot-Prüfung

Durch Zugabe von Neutralrot (Abb. 14) ins Zellmedium kann man unversehrte und stoffwechselaktive Zellen anfärben. Der Farbstoff wird von den Zellen aufgenommen und in Lysosomen gespeichert (DeRenzis 1973). Diese Färbetechnik aus der Mikroskopie kann auch für den Einsatz von Mikrotiterplatten genutzt werden, da die Farbkonzentration im Zelllysat proportional zur Zellzahl ist (Borenfreund 1985; Borenfreund 1988).

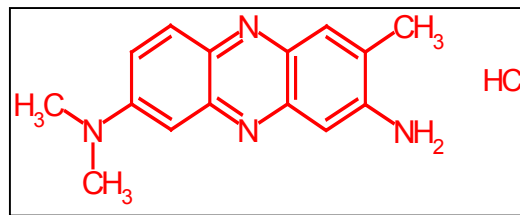


Abb. 14 Strukturformel Neutralrot

1.3.5.4 ATP-sensitive Biolumineszenz

Die Biolumineszenzmessung von ATP beruht darauf, dass ATP in allen metabolisch aktiven Zellen vorhanden ist. Die Biolumineszenzmethode benutzt ein Enzym, die Luciferase, welches die Emission von Licht aus ATP und Luciferin katalysiert (Abb. 15). Die emittierte Lichtintensität ist linear zur ATP-Konzentration und mittels Luminometer gemessen werden (Crouch 1993; Crouch 2000; Slater 2001).

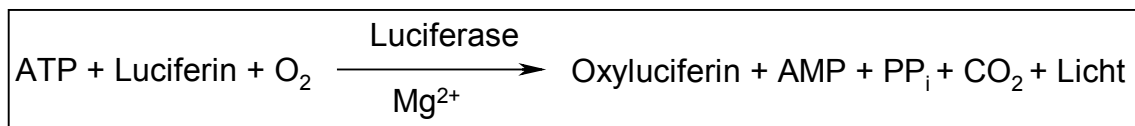


Abb. 15 Reaktionsverlauf bei der ATP-sensitiven Biolumineszenz

1.4 Antisense-Sequenzen gegen NMDA-Rezeptorexpression

In der Vergangenheit sind zahlreiche Antisense-Sequenzen gegen NMDA-Rezeptor-Expression von den verschiedensten Arbeitskreisen auf ihre Wirksamkeit getestet worden. Die meisten Arbeiten wurden entweder mit Primärzellkulturen (d.h. aus frischem Gewebe gewonnenen Zellen) oder am ganzen Tier (Ratte) mit anschließender histologischer Untersuchung der entsprechenden ZNS-Areale durchgeführt.

Eine vielzitierte Arbeit ist hierbei die Veröffentlichung von Wahlestedt et al. aus dem Jahr 1993. Wahlestedt hat insgesamt drei verschiedene Sequenzen gegen den NR1-Subtyp getestet (siehe Tabelle). Die Sequenz 5'-CAG CAG GTG CAT GGT GCT-3', die direkt auf das Initiationscodon folgt und den Nukleotiden 4-21 (vgl. (Karp 1993)) entspricht, hat dabei die höchste Wirksamkeit gezeigt. Es wurden sowohl Bindungsstudien durchgeführt, die eine Abnahme der Dichte der Rezeptorbindungsstellen auf 56 % ergaben, als auch Absterberaten durch NMDA-induzierte Neurotoxizität bestimmt, die durch Behandlung mit entsprechenden Antisense-Oligonukleotiden von 60-70 % auf 50 % der NMDA-sensitiven Neuronen gesenkt werden konnte. Verglichen wurde jeweils zwischen Kulturen, die mit Antisense-, Sense- und Missense (= scrambled)-Oligonukleotiden behandelt wurden.

Tabelle 4 : NMDA-spezifische Antisense-Oligonukleotide

Sequenz [von 5' nach 3']	Target	GC-Anteil [%]	Länge [mer]	Testmodell	AS-Effekt	Referenz
TTC ATG CTT GCG CGT GCT	NR1	55,6	18	Primär-Zellkultur	Ja	(Wahlestedt 1993)
CAT GAG CTC CGG GCA CAG	NR1	66,7	18	Primär-Zellkultur	Ja	(Wahlestedt 1993)
CAG CAG GTG CAT GGT GCT	NR1	61,1	18	Primär-Zellkultur Ratte	Ja	(Wahlestedt 1993)
II				Ratte	Ja	(Soltesz 1994)
II				Ratte	Ja	(Matthies 1995)

Sequenz [von 5' nach 3']	Target	GC-Anteil [%]	Länge [mer]	Testmodell	AS-Effekt	Referenz
II				Zellkultur PC12 Ratte	Ja	(Garry 2000)
II				Maus	Ja	(Zapata 1997)
II				Maus	Ja	(Rydh-Rinder 2001)
II				Ratte	Ja	(Zhu 1998)
II				Frettchen	Ja	(Roberts 1998)
II				Ratte	Ja	(Dean 1998)
II				Ratte	Ja	(Kolhekar 1997)
CGT GCG AAG GAA ACT CAG GTG GAT ACT CTT GTC AGA GTA GAT GGA	NR1	48,9	45	Ratte	Ja	(Gannon 1994)
ATA GTT GGC AAA CTT CCG GTC CCC ATC CTC ATT GAA TTC CAC ACG	NR1	48,9	45	Ratte	Ja	(Gannon 1994)
AGA AGG CCC GTG GGA GCT TTC CCT TTG GCT AAG TTT C	NR2a	56,8	37	Ratte	Nein	(Gannon 1994)
GGG CCT CCT GGC TCT CTG CCA TCG GCT AGG CAC CTG TTG TAA CCC	NR2b	64,4	45	Ratte	Nein	(Gannon 1994)
TGG TCC ACC TTT CTT GCC CTT GGT GAG GTT CTG GTT GTA GCT	NR2c	52,4	42	Ratte	Nein	(Gannon 1994)
AGG AGT GAA GTG AGC AGC AG	NR2c	55,0	20	Zellkultur	Ja	(Pizzi 1999)
GAC AGC AAA GAA GGC CCA CAC	NR2 a,b,c	57,1	21	Zellkultur	Ja	(Pizzi 1999)
GCA GGT GCA TGG TGC TCA TG	NR1	60,0	20	Ratte	Ja	(Lai 2000)
GCC ATC TGC CAC CAG GTG CAC CTC GTA GGT GAA GTT CAT GGT	NR1	57,1	42	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
CTG CAG CAC CTT CTC TGC CTT GGA CTC CCG TTC CTC	NR1a	61,1	36	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
GGG TCC GCG CTT GTT GTC ATA GGA CAG TTG GTC GAG GTT TTC	NR1b	54,8	42	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
TCC ACC CCC GGT GCT CGT GTC TTT GGA GGA CCT ACG	NR1	66,7	36	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)

Sequenz [von 5' nach 3']	Target	GC-Anteil [%]	Länge [mer]	Testmodell	AS-Effekt	Referenz
GCG TCC ACC CCC GGT GCG CTG CAG GTT CTT CCT CCA	NR1	69,4	36	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
TAT CAG TGG GAT GGT ACT CTG CAG GTT CTT CCT CCA	NR1	52,8	36	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
TAT CAG TGG GAT GGT ACT GCT GCA GGT TCT TCC TCC	NR1	52,8	36	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
AGA AGG CCC GTG GGA GCT TTC CCT TTG GCT AAG	NR2a	57,6	33	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
GGG CCT CCT GGC TCT CTG CCA TCG GCT AGG CAC CTG TTG TAA	NR2b	61,9	42	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
TGG TCC ACC TTT CTT GCC CTT GGT GAG GTT CTG GCT GTA GCT	NR2c	54,8	42	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
CAG CCC GGC AGG CAG TGG GGA ACC TCC TGG CAG AAG	NR2d	69,4	36	Ratte	Ja	(Kreutz 1998)
ATC TGC CCA TGG CCA CT	NR2a	58,8	17	Oocyten	Ja	(Zhong 1996)
TGG GCT TCA TCT TCA GCT AG	NR2b	50,0	20	Oocyten	Ja	(Zhong 1996)
G CAG GTG CAT GGT GCT CAT G	NR1	60,0	20	Ratte	Ja	(Standaert 1996)
CA GTA GCC CAA TCT GCC CAT	NR2a	55,0	20	Ratte	Ja	(Standaert 1996)
CTT CAT CTT CAG CTA GTC GG	NR2b	50,0	20	Ratte	Ja	(Standaert 1996)
CCC ACC CAT GTC ACC TGG AG	NR2c	65,0	20	Ratte	Ja	(Standaert 1996)
CAA TCT GCC CAT GGT CGC CA	NR2a	60,0	20	Primär-Zellkultur	Ja	(Bessho 1994)
CGA AGT TCG CGT TCT GTC AC	NR2a	55,0	20	Primär-Zellkultur	Ja	(Bessho 1994)
AAT CTG CCC ATG GTC GCC	NR2a	61,1	18	Ratte	Ja	(Bourguignon 1997)
TCT GCG CTG GGC TTC ATC	NR2b	66,7	18	Ratte	Ja	(Bourguignon 1997)
GGC CCC ACC CAT GTC ACC	NR2c	72,2	18	Ratte	Ja	(Bourguignon 1997)
ACA TTC TTG GTT CCT GGG TCA AAC TGC AGC ACC TTC TCT GCC TTG GAC TCC CGT TCC TCC	NR1	50,0	60	Ratte		(de Waele 1994)

1.5 Ziel der Arbeit

Oligonukleotide haben gegenüber anderen Arzneistoffen den Nachteil, dass sie sehr leicht von körpereigenen DNasen abgebaut werden und zudem ihre zelluläre Bioverfügbarkeit als anionisches Makromolekül eher gering ist. Daher fokussiert sich die Forschungsarbeit auf die Bindung solcher Oligonukleotide an Arzneistoff-trägersysteme, die als Wirkstoffstabilisatoren und Transportvehikel dienen (s.u.). Diese Evaluierung ergab bisher große Vorteile von entsprechenden Präparaten gegenüber ungebundenen Oligonukleotiden, da sich mit den verschiedensten Technologien zeigen ließ, dass sowohl ein enzymatischer Abbau als auch die zelluläre Penetration signifikant verbessert werden kann und dadurch eine Verbesserung der Antisense-Wirkung erzielt wird.

Die Zielsetzung vorhergehender Arbeiten war die Entwicklung neuer Arzneistoffträgersysteme (Drug-Delivery-Systeme) für Oligonukleotide. Dabei kamen folgende Techniken zum Einsatz:

- Liposomen
- Nanopartikel
- Virale Hüllproteine
- Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel

Zu Beginn wurden polymere Nanopartikel untersucht, die über verschiedene kationische Polymere wie z.B. DEAE (Diethylaminoethyl)-Dextran oder auch MMAEMA (Monomethylaminoethyl-methacrylat) verfügten. Damit konnten negativ geladene Oligonukleotide aufgrund ionischer Wechselwirkungen an die kationischen Trägerpolymere gebunden werden. Sowohl biodegradierbare Polymere wie z.B. Cyanoacrylate in Verbindung mit Dextranen als auch biostabile Systeme wie Methylmethacrylate wurden untersucht.

Als alternatives System zu den eher klassischen Techniken wurden rekombinate virale Hüllproteine zu künstlichen Capsoiden assembliert und diese mit Oligonukleotiden beladen. Neuere Ansätze zur galenischen Formulierung von Oligonukleotiden basieren auf der Technik, partikuläre Carrier direkt aus den Oligonukleotiden selbst zu bilden. Hierzu wurde erfolgreich eine neue Methode mit Hilfe von Protamin als DNA-bindende Komponente etabliert. Sogenannte PrOtics (Protamin-Oligonukleotid-Partikel) sind eine kolloidale DNA-Fällung mit Hilfe des kationischen Peptides Protamin.

Als Testsysteme für solche Oligonukleotidformulierungen wurden bisher überwiegend antivirale Testsysteme (HSV 1, D-HBV) eingesetzt. Für das weitere Screening solcher Arzneistoffträgersysteme sind aber virale Testsysteme nur bedingt geeignet, so dass neuere Arbeiten auf die Modulation der Expression bekannter Proteine bzw. Rezeptoren zielen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs ist eine Evaluierung der verschiedenen Arzneistoffträgersysteme und das Screening geeigneter Antisense-Wirkstoffe gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Als Testsystem wird eine von der AG Steinhilber im Rahmen des Graduiertenkollegs (Kollegiat: Ralf Steinmetz) entwickelte Zelllinie zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um Ltk(-)-Zellen die mit den beiden NMDA-Untereinheiten NR1a und NR2A im Verhältnis 1:5 cotransfiziert wurden. Dieses Testsystem erlaubt einen Nachweis der Funktionalität der NMDA-Rezeptoren über den Zelltod. Für den Nachweis der selektiven Expressionshemmung soll eine Western-Blot-Methode auf Proteinebene entwickelt werden, die eine quantitative Beurteilung der Proteinexpression erlaubt. Grundsätzlich ist der Assay für Screening-Verfahren gut geeignet.

Für das Screening von Antisense-Sequenzen sollen im Rahmen des Projektes bekannte Sequenzen aus der Literatur berücksichtigt werden. Alle oben genannten Varianten von Arzneistoffträgersysteme sollen in Bezug auf Zellaufnahme, Wirkstofffreigabe und zytotoxische Nebenwirkungen getestet werden. Schwerpunktmäßig soll aber der Bereich der biodegradierbaren Nanopartikel sowie Proticles untersucht werden.

2. Zusammenfassende Darstellung der veröffentlichten Originalarbeiten

In dieser zusammenfassenden Darstellung werden die veröffentlichten Originalarbeiten kurz vorgestellt, sowie der Zusammenhang zwischen den einzelnen Publikationen hergestellt und der Eigenanteil an den jeweiligen Arbeiten dargestellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Arzneistoffformulierungen, wie kationische Nanopartikel, Liposomen und virale Hüllkapside, für den Transport von Antisense-Oligonukleotiden in Zellen zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der *in vitro* Testung in der Zellkultur. Als Zielstruktur wurde der NMDA-Rezeptor gewählt, dessen Expression durch die Gabe von Antisense-Oligonukleotiden gehemmt wurde. Testobjekt waren Fibroblasten aus der Maus, die in einer Vorgängerarbeit von Dr. Ralf Steinmetz mit der cDNA für die entsprechenden NMDA-Rezeptorsubtypen transfiziert wurden und deren Eignung für die Testung von Rezeptorantagonisten schon gezeigt worden ist. Beim NMDA-Rezeptor handelt es sich um einen ligandgesteuerten Ionenkanal, der normalerweise nur in neuronalem Gewebe zu finden ist. Eine Überexpression und anschließende Stimulation des Rezeptors führt über einen massiven Ca^{2+} -Einstrom zum Absterben der Zellen. Dieses Modell erlaubte die Auswertung der Antisense-Wirkung in einem funktionellen Assay über ein reduziertes Absterbeverhalten der Zellen. Die spezifische Reduktion des Zielproteins wurde mittels Western-Blot-Technik gezeigt.

Zu Beginn der Arbeit wurden die notwendigen Techniken, wie z.B. eine Methode zum Western-Blotting mittels eines Tankblotters, in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anke Rohmann etabliert.

2.1 Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2}

Rohmann, A., Lochmann, D., Weyermann, J., Bertling, W.M., Dinger, Th., Zimmer, A.

Oligonucleotides, 1 (2004), p. 1-9

2.1.1 Eigenanteil

- Etablierung einer Tankblottermethode für Western-Blotting
- Detektion der Membran zur Quantifizierung des Zielproteins durch Antikörper, die mit Alkalischer-Phosphatase konjugiert waren
- Herstellung von mit Oligonukleotiden beladenen kationischen Liposomen (Lipofectin)
- physikalische Charakterisierung der Liposomen (Größe und Zetapotential)
- Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

2.1.2 Zusammenfassung der Publikation

Ziel dieser Untersuchungen war die Entwicklung einer indirekten Zellproliferations-Bestimmungsmethode zum Screening von Antisense-Oligonukleotiden. Es wurden unmodifizierte und phosphorothioat-modifizierte Oligonukleotide mit verschiedenem Schwefelgehalt auf ihre biologische Aktivität untersucht. Der humane Wachstumsfaktorrezeptor p185^{erbB-2} wurde als zelluläres Ziel gewählt. Eine hohe Expression dieses Rezeptorproteins wird in Zusammenhang gebracht mit der Entstehung von Tumoren und einer erhöhten Zellproliferation.

Die Expression des Protein p185^{erbB-2} wurde mit der Zellproliferation von BT-474 Brustkrebszellen korreliert, so dass diese Zelllinie für die Untersuchungen verwendet wurde. Als Kontrollzelllinie wurden zusätzlich MCF-7-Zellen kultiviert, die nur eine niedrige Expression von p185^{erbB-2} aufweisen.

Die Antisense-Oligonukleotide wurden in Form von kationischen Liposomen in die Zellen transportiert. Zuvor wurden die Größe der Liposomen mittels dynamischer Lichtstreuung und Ladung über das Zetapotential bestimmt. Es konnte ein Antisense-Oligonukleotid mit phosphorothioat-modifiziertem Rückgrat identifiziert werden, welches im Vergleich zu zwei Kontrollsequenzen die Zellproliferation hemmen konnte.

Für diese Studie wurde eine Western-Blot Methode gewählt, um den spezifischen p185^{erbB-2}-Proteingehalt im Vergleich zu einer unspezifischen Gesamtproteinbestimmung, die mittels BCA-Bestimmung durchgeführt wurde, darzustellen. Um unspezifische Blottingeffekte auszugleichen, wurde der p185^{erbB-2}-Gehalt der Proben bezogen auf den Gehalt des Strukturproteins Lamin B, welches nicht beeinflusst werden sollte (p185^{erbB-2}/Lamin B). Es wurde ein Zusammenhang zwischen der antiproliferativen Wirkung, die über das Gesamtprotein bestimmt wurde, und dem p185^{erbB-2}-Spiegel im Western Blot gefunden. Der p185^{erbB-2}-Gehalt wurde um bis zu 53 % nach Behandlung mit Antisense-Sequenz reduziert, wohingegen die Kontrollsequenz den p185^{erbB-2} Gehalt nicht beeinflusst hat.

Als weitere grundlegende Techniken wurden vier verschiedenen *in vitro* Zytotoxizitäts-Modellen (LDH-, MTT-, Neutralrot- und ATP-Biolumineszenz-Assay) eingeführt und die zellschädigende Wirkung von drei verschiedenen Modellsubstanzen (Triton X, Chloroquin und Natriumazid) im Vergleich zur Überexpression und Stimulation von NMDA-Rezeptoren im Zellmodell untersucht, um unterschiedliche toxische Reaktionen auf die Zellen differenziert zu erfassen. Die Testsysteme wurden anhand der EC₅₀-Werte und weiterer Parameter mit den Modellschubstanzen charakterisiert.

Anhand dieser Ergebnisse wurde der MTT-Assay als geeignete Methode für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

2.2 Comparison of cytotoxicity assays

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer

International Journal of Pharmaceutics; in press (2004)

2.2.1 Eigenanteil

- Etablierung von vier verschiedenen *in vitro* Zytotoxizitäts-Modellen:
 - LDH- Assay
 - MTT- Assay
 - Neutralrot- Assay
 - ATP-Biolumineszenz-Assay
- Bestimmung und Vergleich der zellschädigenden Wirkung im Zellmodell von
 - Triton X
 - Chloroquin
 - Natriumazid
 - Überexpression und Stimulation von NMDA-Rezeptoren
- Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

2.2.2 Zusammenfassung der Publikation

In dieser Studie wurden vier Zytotoxizitäts-Bestimmungsmethoden und vier zytotoxische Mechanismen in einem einzigen zellulären System verglichen. Die zelluläre Antwort und ihre Wirkung wurden charakterisiert.

Die verwendeten Nachweismethoden für die Zellschädigung basieren auf verschiedenen Mechanismen, wie LDH-Freisetzung, MTT-Metabolismus, Neutralrot-Aufnahme und dem ATP-Spiegel in den behandelten Zellen. Als zytotoxische Mechanismen wurden die Modell-Substanzen Triton X-100, Chloroquin und Natriumazid, die üblicherweise in der Zellkultur verwendet werden, sowie die über Stimulation des Ionenkanals NMDA vermittelte Zytotoxizität, welche für das verwendete Zellsystem spezifisch ist, verwendet.

In der ersten Versuchsreihe wurden die Unterschiede zwischen den vier Bestimmungsmethoden nach dem Einsatz von Triton X-100, einem nicht-ionischen Surfactant, untersucht. Die resultierenden Absterbekurven liegen dicht beieinander und zeigen einen parallelen Verlauf. Niedrige Konzentrationen von Triton X-100 scheinen die mitochondriale Aktivität zu induzieren (MTT-Umsatz) und die Aufnahme von Neutralrot zu erhöhen. Wir fanden eine gute Korrelation zwischen den berechneten EC_{50} -Werten (31 bis 80 μ M) für alle angewandten Methoden. Diese gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse kann mit der Wirkweise von Triton X-100 erklärt werden, die durch die Permeabilisation der Zellmembran zu einer schnellen Nekrose der Zellen führt.

Überraschenderweise fanden wir stark abweichende Ergebnisse (EC_{50} 0,1 bis 200 mM) für Chloroquin, unsere zweite Testsubstanz. Wir fanden im LDH- und MTT-Versuch höhere EC_{50} -Werte im Vergleich zur Neutralrot-Aufnahme und dem ATP-Gehalt (beide 0,1 mM). Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Kurven aus dem LDH- und MTT-Versuchen bei höheren Konzentrationen wieder einen Anstieg aufwiesen, der nicht mit einer erhöhten Überlebensrate der Zellen erklärt werden konnte. Für die LDH-Methode konnte dies mit einem reduzierten Umsatz des Substrats durch die Laktatdehydrogenase erklärt werden, da Chloroquin in der Lage ist, dieses Enzym in seiner Aktivität zu hemmen. Dieses Phänomen ist in der Literatur beschrieben und konnte von uns in einem Reagenzglasversuch bestätigt werden, bei dem LDH als Standard gewonnen aus dem Kaninchenmuskel, eingesetzt wurde.

Beim Einsatz von Natriumazid zeigte sich in niedrigen Konzentrationen (0,1 bis 100 mM) eine Erhöhung des MTT-Umsatzes, die zu einer rechnerischen Überlebensrate von über 100 % führte. Natriumazid zeigte in der LDH-Freisetzung

und im MTT-Umsatz nur eine Wirkung in Konzentrationen ab 1 M bzw. 300 mM, welche schon hypertone Lösungen darstellen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der Neutralrot-Aufnahme und dem ATP-Spiegel der Zellen, wo wir EC_{50} -Werte von 4 bzw. 8 mM bestimmen konnten.

Die vierte und letzte Versuchreihe in dieser Studie war der excitotoxischen Wirkung der Überexpression und Stimulation von NMDA-Rezeptoren in der Zellmembran der untersuchten Zellen gewidmet. Der schnelle und massive Einstrom von Calcium-Ionen in die Zellen führt zu einem Absterben der Zellen durch Nekrose innerhalb von einer Stunde. Diese Wirkung kann durch den Einsatz eines Offen-Kanalblockers, wie z.B. Ketamin, verhindert werden. Wir haben die Konzentrationsabhängigkeit von Ketamin auf die Überlebensrate der Zellen untersucht. Die gefundenen EC_{50} -Werte im LDH-, MTT- und ATP-sensitiven Versuch variierten nur geringfügig zwischen 6 und 29 μ M. Die Bestimmung über die Aufnahme von Neutralrot scheint für diese Anwendung nicht geeignet zu sein, da die Absterbekurve sehr flach verläuft und eine maximale Absterberate von nur 50 % erreicht wird, welche nicht mit den Resultaten der anderen beschriebenen Methoden übereinstimmt.

Abhängig von der verwendeten Nachweismethode wurden große Unterschiede in den errechneten EC_{50} -Werten von Chloroquin (0,1 mM bis 200 mM) und Natriumazid (4 μ M bis 1300 μ M) gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass je nach Mechanismus der Zellschädigung eine andere Zytotoxizitäts-Nachweismethode erforderlich ist.

In dieser Studie wurden die Stärken und Schwächen der gebräuchlichsten Nachweismethoden für Zellschädigung verglichen, so dass dadurch Hinweise für die Wahl der geeigneten Methode auch bei anderen Fragestellungen gegeben werden konnten.

Weitere methodische Entwicklungen waren im Rahmen meiner Arbeit nötig. Um Drug-Delivery-Systeme im Zellversuch testen zu können, war es notwendig, die genaue chemische Zusammensetzung zu ermitteln.

Hierzu wurde zur Quantifizierung von Protamin als einem der zentralen Bausteine der Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel in Zusammenarbeit mit Herrn Dirk Lochmann eine neue Methode entwickelt, die über eine Kopplungsreaktion die fluorimetrische Bestimmung erlaubt.

2.3 New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent

Dirk Lochmann, Sylvia Stadlhofer, Jörg Weyermann, Andreas Zimmer;
International Journal of Pharmaceutics; 283 (1-2) (2004), p. 11-17

2.3.1 Eigenanteil

- Mitwirkung an der Entwicklung einer neuen Methode zur Bestimmung von Protamin und Protaminsalzen mittels einer Fluoreszenzderivatisierung in wässrigen Medien für Bestimmungen in Mikrotiterplatten
- Bestimmung der Reaktionskinetik und Stabilität verschiedener Derivate
- Entwicklung eines Messregimes
- Auswertung und Diskussion der Daten

2.3.2 Zusammenfassung der Publikation

Protamin ist ein gebräuchlicher Hilfsstoff in Arzneimitteln. Es handelt sich um ein Peptid aus ausschließlich aliphatischen Aminosäuren, so dass es nicht über UV-Spektroskopie (λ_{max} 280 nm) quantifiziert werden kann.

In dieser Publikation wird eine neue und sensitive Quantifizierungs-Methode in 96-Well-Mikrotiterplatten vorgestellt. Diese Methode basiert auf der Derivatisierung von Protamin mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in basischer wässriger Lösung in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol (ME) oder N-Acetyl-L-cystein (NAC).

Das resultierende Isoindol-Derivat weist ein Absorptionsmaximum λ_{ex} bei 345 nm sowie ein Fluoreszenzemissionsmaximum λ_{em} bei 450 nm auf. Eine ausreichende Stabilität der Isoindol-Derivate wurde gezeigt.

Um die Qualität der erhaltenen Fluoreszenzsignale zu belegen, wurden verschiedene statistische Parameter berechnet. Es wurde ein F-Test durchgeführt mit den Varianzen für (f_1) 0,25 µg/ml und (f_2) 10 µg/ml Protamin für jeweils sechs Messungen, um die Linearität der Kalibrierkurven für die drei untersuchten Protamine (Protamin freie Base, Protaminchlorid und Protaminsulfat) zu zeigen. Für Protamin freie Base ($f_1/f_2 = 234$), Protaminchlorid ($f_1/f_2 = 163$) und Protaminsulfat ($f_1/f_2 = 157$) konnte ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) der Varianzen gezeigt werden.

Zusätzlich wurde eine Kreuz-Validierung mit der bereits etablierten BCA-Bestimmungsmethode mit 50 µg/ml Protamin freie Base durchgeführt. Es wurde ein F-Test mit beiden Varianzen durchgeführt ($f_{1\text{BCA}} = 43,29$; $f_{2\text{OPA}} = 3,57$) und es konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p \geq 0,05$). Der nächste Schritt war die Durchführung eines t-Tests mit den voneinander verschiedenen Varianzen, der für die Mittelwerte beider Methoden eine statistische Gleichheit der Ergebnisse zeigte ($p < 0,05$) (BCA: 51,21 µg/ml \pm 6,58; OPA: 50,08 µg/ml \pm 1,89). Diese Ergebnisse der neuen Bestimmungsmethode mittels OPA konnten somit mit der Referenzmethode bestätigt werden.

Protamin konnte als freie Base, als Protamin-Sulfat und als Protamin-Chlorid mit einer Nachweisgrenze von weniger als 1,1 µg/ml nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Bestimmungsgrenze von weniger als 1,7 µg/ml erreicht.

Derivate des OPA/NAC-Reagenz erwiesen sich als nützlich bei der Quantifizierung von Protamin in pharmazeutischen Nanopartikel-DNA-Präparationen.

Der Stand der Forschung und Technik im Bereich der Drug-Delivery-Systeme für Oligonukleotide, basierend auf rekombinant hergestellten viralen Hüllproteinen, wurde in einem Übersichtsartikel dargestellt, der zusammen mit Frau Christiane Georgens erarbeitet wurde.

2.4 Recombinant virus like particles as Drug Delivery System

Christiane Georgens, Jörg Weyermann and Andreas Zimmer
Current Pharmaceutical Biotechnology, review in press (2004)

2.4.1 Eigenanteil

- Literaturrecherche zu Drug-Delivery-Systemen für Oligonukleotide, die auf rekombinant hergestellten viralen Hüllproteinen basieren
- Darstellung des aktuellen Standes der Forschung und Technik im vorliegenden Übersichtsartikel

2.4.2 Zusammenfassung der Publikation

In diesem Übersichtsartikel werden Arzneistoffträgersysteme beschrieben, die aus Virus-ähnlichen Partikeln bestehen. Der Hauptfokus liegt dabei auf Nanopartikeln aus VP1, eines rekombinant hergestellten Kapsid-Proteins von Polyomaviren.

Polyoma stammt aus der Gruppe der Papovaviridae und befällt Mäuse. Die Virenhülle ist ikosahedrisch und ohne lipidhaltige Hülle („Envelope“). Dieses Kapsid bildet eine Doppelhülle aus und besteht aus drei verschiedenen Kapsid-Proteinen: VP1, VP2 und VP3. Die äußere Hülle besteht aus 360 VP1-Molekülen, die sich zu 72 Pentameren zusammenlagern. Diese Kapside haben einen Durchmesser von ungefähr 50 nm.

Das VP1-Protein ist der Hauptligand für bestimmte Membranproteine des Wirts während der Virusinfektion. Außerdem enthält der N-Terminus des VP1-Proteins eine DNA-bindende Domäne und eine Kernlokalisierungs-Sequenz.

Durch die rekombinante Herstellung erhält man auf sichere Weise den hochgereinigten, nicht-pathogenen pharmazeutischen Hilfsstoff VP1-Protein.

Virusähnliche-Partikel (engl. virus like particles = VLP) stellen ein exzellentes Trägersystem für die *in vitro* Anwendung dar. *In vivo* stellt sich die Anwendung etwas schwieriger dar. Murine VP1-VLPs verursachen eine Antikörperreaktion in normalen und immundefizienten Mäusen. T-Zell-unabhängige antivirale IgM- und IgG-Antworten wurden in T-Zell-defizienten Mäusen untersucht. Diese Tiere wurden mit dem löslichen Strukturprotein VP1, VLPs und ganzen Polyomaviren infiziert. Bei jedem Antigen zeigte sich eine IgM-Antwort. Dahingegen war nur bei der Injektion von ganzen Polyomaviren eine IgG Erhöhung festzustellen. Diese Eigenschaft könnte genutzt werden, um hoch immunogene VLPs für die Entwicklung von neuen Impfstoffen zu entwickeln.

VP1-Proteine besitzen sowohl eine „targeting“- als auch eine Arzneistoff-Bindungsstelle und können daher als sicheres Arzneistoffträgersystem für die Gentherapie benutzt werden. Unter den derzeit verwendeten Anwendungsbereichen befinden sich Oligonukleotide und kleine (Arzneistoff-) Moleküle ebenso wie Impfstoffe.

Alle in meinen Studien eingesetzten Trägersysteme wurden hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften untersucht. Im Mittelpunkt standen dabei die Bestimmung von Größe und Oberflächenladung, die mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) und der Zetapotential-Messung bestimmt wurden. Die Ergebnisse der DLS-Methode wurden mit der relativ neuen Technik der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) verglichen.

Kationisierte Polybutyl-cyanoacrylat- (PBCA-) Nanopartikel dienten hierbei als Modellpartikel. FCS-Messung sind nur mit fluoreszierenden Partikeln möglich; aus diesem Grund wurden zwei neue Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von PBCA-Nanopartikeln entwickelt. Zum einen wurde durch den Einbau von fluoreszenzmarkiertem Dextran in die Partikelmatrix der gesamten Partikel markiert und zum anderen war es auch möglich, nachträglich über eine Kopplungsreaktion mit den auf der Oberfläche vorhandenen Hydroxylfunktionen ein Fluorophor anzubringen. Zusätzlich konnte mit dieser Methode die molekulare Masse der Nanopartikel bestimmt werden.

2.5 Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Christiane Georgens, Isam Rais,
Jörg Kreuter, Michael Karas, Markus Wolkenhauer, Andreas Zimmer
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 58 (2004), 25-35

2.5.1 Eigenanteil

- Herstellung der verschiedenen PBCA-Nanopartikelzubereitungen
- Entwicklung zweier neuer Fluoreszenzmarkierungen der PBCA-NP mittels (I) Rhodamin B oder FITC gekoppeltem Dextran und (II) kovalente Bindung von DTAF an die NP
- Aufreinigung dieser Präparationen durch Dialyse
- Erarbeitung einer Kryopräparation der NP für die Mikroskopie
- Aufnahme von Bildern der Nanopartikel mittels atomic force microscopy (AFM) und scanning electron microscopy (SEM)
- Teilchengrößenbestimmung der verschiedenen Präparationen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und der Oberflächenladung (Zetapotential)

- Vorbereitung der Partikelpräparationen für MALDI-TOF- und FCS-Messungen
- Auswertung und Diskussion der erhaltenen Daten

2.5.2 Zusammenfassung der Publikation

Ziel dieser Studie war der Vergleich verschiedener physikalischer und chemischer Methoden mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS). Damit wurden kationische Acrylat-Nanopartikel charakterisiert, mit denen Oligonukleotide in Säugerzellen transportiert werden können.

Es kamen drei verschiedene Methoden zur Herstellung von fluoreszenzmarkierten PBCA-Nanopartikeln zum Einsatz.

Bei der Methode A werden positiv geladenen Nanopartikel aus Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) und Poly-(n-butyl-2-cyanoacrylat) (PBCA) hergestellt. Sie bestehen aus PBCA-Oligoketten mit einem PBCA-9-mer als durchschnittlicher Größe. Die Länge der PBCA-Oligoketten wurde mittels Massenspektroskopie (MALDI-TOF MS) untersucht. Die Bildung der Nanopartikel erfolgt durch Zusammenlagern von DEAE-Dextran und Dextran 70,000 zur Partikelmatrix. Das Molekulargewicht eines Partikels von 108 nm Durchmesser wurde auf ungefähr $3,6 \times 10^8$ Dalton abgeschätzt. Diese Partikel besitzen kein eigenes Fluorophor und können daher nur im Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskop vermessen werden, nachdem auf die Oberfläche adsorptiv fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide aufgebracht wurden. Um mehr Information über den Aufbau, die Größe und die Masse der PBCA-Nanopartikel mittels FCS zu erhalten, wurden zwei neue Techniken zur Fluoreszenzmarkierung entwickelt.

Zur Fluoreszenzmarkierung nach Methode B werden Rhodamin B-Dextran oder FITC-Dextran in die Partikelmatrix eingeschlossen.

Bei Methode C werden die Partikel wie bei Methode A beschrieben hergestellt und nachträglich ein Teil der Hydroxylgruppen des Dextrans bzw. am Kettenende des Polybutylcyanoacrylats mit 5-((4,6-Dichlorotriazin-2-yl)amino)-fluoreszein (DTAF) derivatisiert. Der nicht gebundene Farbstoff wurde mittels Dialyse abgetrennt.

Die Durchschnittsgröße der Nanopartikel liegt im Bereich von $d_H = 130$ nm bis 140 nm. Dies wurde unabhängig voneinander durch FCS und dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden sowohl

Bilder mit Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM) auch mittels Raster-Elektronen-Mikroskopie (SEM) aufgenommen. Die AFM-Technik erlaubt aufgrund der Abtastung der Oberfläche eine genauere Aussage über deren Struktur. Die Partikel zeigten eine runde Form und eine glatte Oberfläche. Der durchschnittliche Ferret-Durchmesser lag bei $d_f = 122 \pm 48$ nm. Die Auswertung der SEM-Bilder ergab einen durchschnittlichen Durchmesser $d_f = 140 \pm 37$ nm.

Oligonukleotide können als Komplex mit den Nanopartikeln durch Zwei-Farben-Fluoreszenz mittels Kreuz-Korrelation der FCS-Signale lokalisiert werden.

Es wurden Zetapotentialmessungen durchgeführt, um die Oberflächenladung der Partikel zu charakterisieren. Eine gleichbleibende Menge von Nanopartikeln nach Methode A (100 µg) wurde mit einer steigenden Menge an Oligonukleotiden (12,5 bis 200 µg) in Wasser inkubiert. Das Zetapotential der unbeladenen Nanopartikel lag bei circa + 39 mV und sank bei Zugabe eines Überschusses von 100 µg Oligonukleotid auf – 40 mV. Ab diesem Massenverhältnis von 1 : 1 sank das Zetapotential nur noch wenig.

Die Oligonukleotid-Beladung wurde nach Zentrifugation der Partikel durch starke Anionen-Austausch-HPLC (SAX HPLC) und FCS mit ungefähr 20 µg Oligonukleotid pro 100 µg Nanopartikel bestimmt. Die FCS-Messungen *in situ* zeigten eine höhere ON-Beladung von ungefähr 50 µg ON pro 100 µg NP.

Der Schwerpunkt der Entwicklung von Drug-Delivery-Systemen lag jedoch auf den biodegradierbaren Nanopartikeln auf Basis von Protamin. Daher wurde auch diese Partikelklasse intensiv in Zusammenarbeit mit Herrn Dirk Lochmann physiko-chemisch untersucht.

2.6 Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles

Dirk Lochmann, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Norbert Dinauer, Hagen von Briesen, Jörg Kreuter, Dieter Schubert, Andreas Zimmer
Journal of Microencapsulation; in press (2004)

2.6.1 Eigenanteil

- Herstellung von Partikelpräparationen mit verschiedenem PTO/Protamin Verhältnis
- Fluorimetrische Bestimmung der Nanopartikel-Zusammensetzung mittels Fluoreszenzmarkierung des Protamins mit TRITC
- Bestimmung des Einflusses von PTO/Protamin-Verhältnis, Oligonukleotid-Größe und -Konzentration auf den hydrodynamischen Durchmesser mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS)
- Bestätigung der Messergebnisse mit Rasterelektronenmikroskopie als alternativer Methode zur DLS
- Ermittlung des Einflusses der Protaminmenge in den Partikeln auf die Oberflächenladung mittels Zetapotentialbestimmungen
- Auswertung und Diskussion der erhaltenen Ergebnisse

2.6.2 Zusammenfassung der Publikation

Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel sind ein effektives kolloidales Arzneistoff-trägersystem für Antisense Phosphorothioat-Oligonukleotide (PTO).

In dieser Studie beschreiben wir eine verbesserte Herstellungsmethode für diese Nanopartikel und stellen deren physiko-chemischen Eigenschaften dar. Der Einfluss der Konzentrationen der einzelnen Bestandteile, der Länge der PTO-

Kette und des Massenverhältnisses von PTO zu Protamin auf die Partikelbildung sowie die Größe, Form und Oberflächenladung der Partikel wurden detailliert untersucht.

Aus freier Protaminbase (PFB) und PTO wurden in wässriger Lösung Nanopartikel mit Durchmessern von 90 bis 200 nm. Die chemische Zusammensetzung dieser Nanopartikel wurde analysiert. Mehr als 90 % der PTO wurden in die Matrix des Partikels integriert, wenn ein Verhältnis von $\geq 1:2$ (w/w) von PTO und PFB eingesetzt wurde. Ungefähr 53-68 % der PFB wurde in die Nanopartikelmatrix eingebunden. Diese Komplexe hatten ein Zetapotential von -19 mV bis $+32$ mV, abhängig vom PTO/PFB-Verhältnis.

Die Kinetik der Zusammenlagerung dieses binären Systems wurde durch dynamische Lichtstreuung (DLS) und durch Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit in der analytischen Ultrazentrifuge (AUC) beobachtet. Zusätzlich wurden Bilder aus der Raster-Elektronen-Mikroskopie (SEM) und der Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM) analysiert, um die Ergebnisse weiter abzusichern.

Die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeit ergab, dass die Partikel in Wasser nur mäßig und in Salzlösungen nicht stabil sind. Durch Polyethylenglykol 20,000 konnte jedoch die kolloidale Lösung in Wasser stabilisiert werden, dies führte auch zu einer verbesserten Stabilität in gepufferten Medien während der Messungen in der analytischen Ultrazentrifuge.

Ausgehend von Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikeln, die auf eine Arbeit von Frau Monika Junghans zurückgehen, konnte gezeigt werden, dass sich diese durch den Zusatz von humanem Serumalbumin (HSA) stabilisieren lassen. Durch Veränderung des Verhältnisses der Ausgangsstoffe zueinander lassen sich sowohl die Größe als auch die Oberflächenladung steuern.

2.7 Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation

Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Christiane Georgens, Ruth Prassl, Andreas Zimmer

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, in press (2004)

2.7.1 Eigenanteil

- Herstellung von Albumin-Protamin-Oligonukleotid Nanopartikeln
 - in MilliQ-Wasser
 - unter isotonischen Bedingungen in Zellmedium
- Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser und der Größenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung sowie der Oberflächenladung (Zetapotential)
- Untersuchung der Nanopartikel in ihrer Form und Größe mittels Raster-Elektronen-Mikroskopie
- Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

2.7.2 Zusammenfassung der Publikation

In dieser Publikation wird erstmals ein ternäres System aus Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikeln (AlPrO-NP) beschrieben, das als potentiellles Arzneistoffträgersystem für Oligonukleotide Verwendung finden könnte.

Frühere Untersuchung mit binären Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikeln haben zwei hauptsächliche Nachteile gezeigt: (I) Aggregation der Partikel innerhalb weniger Minuten in Gegenwart von Salzen, (II) geringe intrazelluläre Dissoziation von Protamin und Oligonukleotid, insbesondere bei Phosphorothioaten. Um diese

Probleme zu lösen, wurde humanes Serumalbumin (HSA), ein untoxisches, biodegradierbares Makromolekül, als Schutzkolloid hinzugefügt.

Der Prozess der Zusammenlagerung von AlPrO-Nanopartikeln wurde durch Engwinkel-Röntgen-Streuung (SAXS), Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) und Scanning-Elektronen-Mikroskopie (SEM) untersucht. Es wurden Initialkomplexe aus HSA und Protaminsulfat mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser (d_h) von 10 bis 14 nm gefunden. Nach Zugabe der Oligonukleotide (unmodifizierte, Phosphorothioat-DNA oder siRNA) bildeten sich sowohl in Wasser als auch in isotonischen Medien bei den meisten Präparationen Nanopartikel mit einem d_h von 230 bis 320 nm.

Die chemische Zusammensetzung der Nanopartikel wurde mittels HPLC und Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht. Ungefähr 7 % bis 10 % (w/w) des humanen Serumalbumins wurde in den Partikeln gebunden.

Die Oberflächenladung der Nanopartikel betrug in Abhängigkeit von der Protaminkonzentration und den Ionenverhältnissen in der Lösung zwischen + 12 mV und – 60 mV.

Die Größe und das Molekulargewicht der Komponenten, der Initialkomplexe und von zwei Modell-Nanopartikel-Präparationen wurden aus FCS-Daten errechnet. Diese Daten wurden durch PCS-, SEM- und SAXS-Messungen verifiziert.

Im Anschluß an diese physikochemische Charakterisierung wurden diese Partikel in der Zellkultur im Vergleich zu freien, d.h. nicht an ein Trägersystem gebundenen, und zu liposomal (DOTAP) verpackten Oligonukleotiden getestet. Es zeigt sich, dass die Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Formulierung gegenüber den freien Oligonukleotiden eine um den Faktor 12 verbesserte zelluläre Aufnahme aufweisen, was mit der Liposomen-Formulierung vergleichbar ist. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass 100 % der Zellen transfiziert worden sind. Es wurde sowohl im funktionellen Modell über Zelltod, als auch auf Proteinebene (Western-Blot) eine spezifische Reduktion des NMDA-Rezeptors von etwa 35 % 24 Stunden nach der Gabe des Oligonukleotids gefunden. Dieses Ergebnis spricht für eine intrazelluläre Freigabe der Oligonukleotide aus den Partikeln. Im Gegensatz zur liposomalen Zubereitung wurden keine zytotoxischen Nebenwirkungen der Nanopartikel gefunden.

2.8 Albumin-Protamine-Oligonucleotide-Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Christiane Georgens, Andreas Zimmer
Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, in press (2004)

2.8.1 Eigenanteil

- Herstellung und Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotid-Präparationen
- Untersuchung der Zellaufnahme unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden:
 - quantitativ mittels Mikrotiterplatten-Leser
 - qualitativ mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie
- Bestimmung der zytotoxischen Nebenwirkungen der Trägersysteme
- Bestimmung und Vergleich der erzielten Antisense-Wirkung im Vergleich zu einer Kontroll-Sequenz (scrambled Sequenz)
 - im funktionellen Modell über Zelltod (MTT-Assay)
 - auf Proteinebene durch Western-Blot-Analyse
- Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

2.8.2 Zusammenfassung der Publikation

Antisense-Oligonukleotide werden seit vielen Jahren als spezifisches Werkzeug genutzt, um die Expression von krankheitsverursachenden Genen zu verhindern. Leider zeigen Oligonukleotide als polyanionische Makromoleküle eine geringe Permeabilität durch biologische Membranen und werden zudem rasch von Nukleasen abgebaut.

Mit den vorliegenden Untersuchungen soll ein Trägersystem etabliert werden, das eine verbesserte Aufnahme in Zellen und eine intrazelluläre Dissoziation der Oligonukleotide erlaubt. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein neues nanopartikuläres System entwickelt, das aus humanem Serumalbumin, Protaminsulfat und Antisense-Oligonukleotiden besteht (AlPrO).

Diese neuen Nanopartikel wurden an Mäuse-Fibroblasten getestet, die stabil mit dem N-Methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptor (NR) transfiziert waren. Diese Zelllinie erlaubt *in vitro*-Studien zur Aufnahme in Zellen, zur intrazellulären Dissoziation und zur Wirkung der Antisense-Oligonukleotide in einem einfachen Excitotoxizitäts-Modell. Die Ergebnisse der AlPrO-Nanopartikel wurden mit freien Oligonukleotiden und mit einer kommerziell erhältlichen Liposomen-Präparation (DOTAP) verglichen.

Die Zellaufnahme der Oligonukleotide kann unter zwei Gesichtspunkten beurteilt werden, die Transfereffizienz und die intrazelluläre Verteilung.

Die Transfereffizienz wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes bestimmt, indem die Fluoreszenzintensität des Zelllysates nach vorhergehender Inkubation mit entsprechend fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden bzw. deren Präparationen ausgewertet wurde. Zusätzlich wurde die Fluoreszenzintensität auf den Gesamtproteingehalt des Lysates und damit auf die tatsächliche Zellzahl bezogen. Mit AlPrO-Nanopartikeln wurde ein zwölfacher Anstieg der Aufnahme von Oligonukleotiden in die Zellen im Vergleich zu freien Oligonukleotiden beobachtet.

Die intrazelluläre Verteilung der transferierten Oligonukleotide wurde mittels konfokaler Laser Scan-Mikroskopie untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit freien FITC-markierten Oligonukleotiden bzw. deren Präparationen vier Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde die Zellmembran mit einem TRITC-markierten pflanzlichen Lectin dem Concanavalin A angefärbt. In Übereinstimmung mit den

Transferversuchen, war die Aufnahme von freien Oligonukleotiden vernachlässigbar. Die mit den DOTAP-Liposomen behandelten Zellen zeigten eine sehr heterogene Verteilung der Fluoreszenz, d.h. manche Zellen hatten gar kein Oligonukleotid aufgenommen, wohingegen andere Zellen eine sehr hohe Fluoreszenz zeigten, die allerdings auf bestimmte distinkte Zellbereiche beschränkt war.

Die mit AlPrO-Nanopartikeln inkubierten Zellen zeigten alle eine Fluoreszenz, wobei diese über das gesamte Zytoplasma verteilt war. Es war ein Kernschatten zu erkennen, was ein Zeichen dafür ist, dass die Oligonukleotide nicht in den Kern aufgenommen wurden.

Die Präparationen wurden hinsichtlich ihrer *in vitro* Toxizität mittels einer MTT-Zytotoxizität Bestimmungsmethode untersucht.

Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt, wohingegen mit Triton X-100 behandelte Zellen zur Bestimmung der Sensitivität genutzt wurden. Das Ergebnis zeigte, dass nach 24-stündiger Applikation von den mit DOTAP-Liposomen behandelten Zellen nur noch 50 % lebten. Im Gegensatz hierzu zeigten die AlPrO-Nanopartikeln nur in hohen Konzentrationen eine geringe zytotoxische Reaktion.

Bei der Untersuchung der Antisensewirkung wurde in einem ersten Schritt die Zusammensetzung der Nanopartikel optimiert. Es wurden verschiedene Verhältnisse von Oligonukleotid zu Protaminsulfat in einem Bereich von 1 : 1 bis 1 : 3 bei einem konstanten HSA-Anteil betrachtet. Entsprechend den physiko-chemischen Ergebnissen war die Wirkung der 1 : 1-Präparation sehr gering, was mit einem hohen negativen Zetapotential (– 22 mV) und der damit verringerten Zellaufnahme erklärt werden kann. Die 1 : 1,5-Präparation zeigte eine Tendenz zum Aggregieren. Die resultierenden großen Partikel von 650 nm Durchmesser wurden ebenfalls schlecht von den Zellen aufgenommen und hatten daher auch nur eine geringe Wirkung. Ab einem Verhältnis von 1 : 2 stieg die Zellaufnahme und damit auch die Wirksamkeit der gebundenen Antisense-Oligonukleotide. Die 1 : 2-Präparation hatte eine Antisense-Wirkung von ca. 28 % und die 1 : 3-Präparation von 32 % jeweils bezogen auf eine scrambled-Kontrolle, die keine spezifische Wirkung zeigen sollte. Diese Ergebnisse waren im t-Test auch statistisch signifikant bzw. hoch signifikant. Das Wirkmaximum war bei einer

Oligonukleotid-Konzentration von 1 μM in der Inkubationslösung erreicht, eine Erhöhung auf 2 μM brachte keine weitere Verbesserung.

In einem zweiten Schritt wurde die als optimal befundene 1 : 3-Präparation im Vergleich zu freien Oligonukleotiden und DOTAP-Liposomen getestet. Wie erwartet hatten die freien Oligonukleotide nur eine spezifische Wirkung von 5 %. Mit DOTAP wurde eine Wirkung von 35 % erreicht.

Um diese Ergebnisse aus dem funktionellen Modell zu bestätigen und zu zeigen, dass die Wirkung auf einer spezifischen Expressionshemmung des NMDA-Rezeptors durch Antisense-Oligonukleotide (AS-ON) beruht, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Ein Ergebnis war, dass die Zellen, die mit AS-ON behandelt wurden, abhängig von der verabreichten Konzentration auch weniger NR-Protein bilden. Zellen, die mit der scrambled-Kontrolle inkubiert wurden, zeigten unveränderte Protein-Spiegel.

Die Ergebnisse der Zellpenetration und des Antisense-Versuchs zeigen, dass AlPrO-Nanopartikel einen vielversprechende Träger für die Anwendung von Oligonukleotiden darstellen.

In einem abschließenden Vergleich wurden rekombinant hergestellte virale Hüllkapside (VP1 Kapside), zwei kationische liposomale Zubereitungen (DOTAP/Lipofectin), zwei kationische Alkylcyanoacrylat-Nanopartikelpräparationen (PBCA/PHCA) und zwei auf Protamin basierende Nanopartikelsysteme (mit/ohne Albumin-Zusatz) in der Zellkultur getestet. Untersucht wurde die Transfereffizienz für Oligonukleotide mittels einer Fluoreszenzmethode. Außerdem wurde die intrazelluläre Verteilung im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop dargestellt. Die Antisense-Wirkung wurde im Vergleich zu einer Kontrollsequenz bestimmt (sowohl im funktionellen System, als auch im Western-Blot) und die zytotoxischen Nebenwirkungen wurden betrachtet.

Zusammenfassend ergaben diese Ergebnisse eine um das 2- bis 18-fache Erhöhung der Zellaufnahme im Vergleich zu freien Oligonukleotiden. Die protamin-basierten Nanopartikel zeigten keine nennenswerten zytotoxischen Nebenwirkungen. Die beste Wirkung wurde von Lipofectin-Liposomen gezeigt, die eine Reduktion des NMDA-Rezeptors um mehr als 50 % im funktionellen Modell und von mehr als 60 % im Western-Blot zeigten.

2.9 Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann and Andreas Zimmer

Journal of Controlled Release; 100 (3) (2004), p. 411-423

2.9.1 Eigenanteil

- Herstellung und Charakterisierung der verwendeten Oligonukleotid-Präparationen:
 - VP1-Kapside
 - PBCA/DEAE-Dextran Nanopartikel,
 - PHCA/DEAE-Dextran Nanopartikel,
 - DOTAP-Liposomen,
 - Lipofectin-Liposomen,
 - Protamin-Oligonukleotid Nanopartikel (PrOticle)
 - Protamin-Oligonukleotid Nanopartikel mit HSA (AIPro-NP)
- Untersuchung der Zellaufnahme unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden

- qualitativ mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie
- quantitativ mittels Mikrotiterplatten-Leser
- Bestimmung und Vergleich der erzielten Antisense-Wirkung im Vergleich zu einer scrambled Sequenz
 - im funktionellen Modell über Zelltod (MTT-Assay)
 - auf Proteinebene über Western-Blot-Analyse
- Bestimmung der zytotoxischen Nebenwirkungen der Trägersysteme
- Auswertung und Diskussion der Ergebnisse

2.9.2 Zusammenfassung der Publikation

Antisense-Oligonukleotide sind spezifische Arzneistoffe, um die Genexpression auf der Transkriptionsebene zu verhindern. Sie haben eine geringe Bioverfügbarkeit und können rasch von Nukleasen abgebaut werden. Daher gibt es einen hohen Bedarf für die Entwicklung von Oligonukleotid-Trägersystemen.

In der vorliegenden Publikation wurden ein künstlicher Virus (VP1-Kapside), zwei kommerziell erhältliche Liposomen-Präparate (DOTAP, Lipofektin), zwei kationische Acrylat-Nanopartikel-Systeme und zwei Protamin-basierte Nanopartikel-Präparationen verglichen. Der Vergleich erfolgte hinsichtlich physikalische Parameter (einschließlich Größe, Größenverteilung und Oberflächenladung) und die Zytotoxizität der verschiedenen Trägersysteme bestimmt.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand jedoch die Aufnahme in Zellen, zum einen wurde mit einer Fluoreszenz-Methode die Menge der aufgenommen Oligonukleotide quantifiziert und zum anderen mittels konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie (CLSM) die intrazelluläre Verteilung untersucht.

Um den Zelltransfer zu quantifizieren, wurde die Fluoreszenzintensität im Zellysat gemessen und auf die eingesetzte Zellzahl bezogen, die über den Gesamtproteingehalt im Lysat bestimmt wurde. Nach vierstündiger Inkubation zeigten alle Oligonukleotid-Präparationen eine erhöhte Aufnahme im Vergleich zu freien Oligonukleotiden. Die Aufnahme war um den Faktor 6 bis 10 erhöht, einzige Ausnahmen waren VP1-Kapside (Faktor zwei) und PrOicle (Faktor 18).

Die schlechte Aufnahme der VP1-Kapside kann mit dem rezeptorvermittelten Aufnahmemechanismus erklärt werden, welcher einer Kinetik nullter Ordnung

unterliegt und abhängig ist von der Anzahl der vorhandenen Rezeptoren. Unter dem Mikroskop zeigten sich die aufgenommenen FITC-markierten Oligonukleotide als kleine fluoreszierende Punkte in der Kernregion der Zelle.

Die mit DOTAP-Liposomen behandelten Zellen zeigten eine heterogene Verteilung der Fluoreszenz. Die FITC-Oligonukleotide schienen in Vesikeln in bestimmten distinkten Zellarealen konzentriert zu sein. Der Zellkern erschien auf den Bildern als ungefärbter Kernschatten. Im Vergleich zu diesen Ergebnissen mit DOTAP waren die mit Hilfe von Lipofectin transportierten Oligonukleotide mehr zytosolisch und weniger vesikulär verteilt. Die Versuche mit kationisierten Acrylatpartikeln zeigten wenige diskrete intrazelluläre fluoreszierende Punkte, welche wahrscheinlich in Vesikeln lokalisiert waren. Interessanterweise fingen die Zellen nach der vierstündigen Inkubation an sich „abzukugeln“, d.h. es waren erste Anzeichen des Absterbens der Zellen zu beobachten, welches sich bei den späteren Zytotoxizitätstests bestätigte. ProTicle waren ein sehr effektives Transportvehikel für Oligonukleotide, allerdings führte die Tendenz zum Aggregieren im Zellmedium dazu, dass große Partikel in der Zellmembran stecken blieben. Allerdings war auch das Zytosol angefärbt und einzig der Zellkern war als dunkeler Schatten zu erkennen. Die besten Ergebnisse wurden mit AIPRO-NP erzielt, die eine gleichmäßige Anfärbung des Zytosols zeigten und von denen weniger Partikel in der Zellmembran stecken blieben.

Der nächste Schritt bei der Untersuchung der verschiedenen Trägersysteme war die Bestimmung der unspezifischen Zytotoxizität, die allein durch die Trägersysteme hervorgerufen wird. Hierzu wurden entsprechende Präparationen mit allen Trägersystemen hergestellt und im Vergleich zu freien Oligonukleotiden die Überlebensrate der Zellen nach 24-stündiger Inkubation in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 2 μ M bestimmt. Es zeigte sich, dass freie Oligonukleotide und die beiden Protaminzubereitungen nur einen vernachlässigbaren Einfluss haben. Die beiden liposomalen Trägersysteme hatten ein Absterben von 40 – 50 % der Zellen zur Folge. Bei den beiden Alkyl-Cyanoacrylat-Nanopartikel Präparationen überlebten sogar nur weniger als 20 % der Zellen.

Mäusefibroblasten, die stabil mit der cDNA von des N-Methyl-D-aspartat-Rezeptors (NR) transfiziert waren, wurden als excitotoxisches Testsystem

verwendet. Antisense-Oligonukleotide gegen die NR-mRNA wurden in einem funktionellen Modell zur Bestimmung eines spezifischen Antisense-Effekts in dieser Zelllinie verwendet.

Wie erwartet hatten freie Oligonukleotide nur eine geringe Wirkung von 5 %. Mit dem Einsatz von VP1-Kapsiden und PrOticlen ließ sich diese Wirkung verdoppeln auf 10 %. Problematisch bei der Anwendung von PrOticlen scheint auch hier wieder die Neigung zur Aggregation sowie die hohe Stabilität der Komplexe zu sein. Eine bessere Möglichkeit zum Transport von Oligonukleotiden in Bezug zur erreichbaren Wirkung stellen DOTAP, PBCA-, PHCA- und AlPrO-Nanopartikel dar, mit denen eine Wirkung von 25 bis 35 % möglich war. Bemerkenswert war die Wirkung von mittels Lipofectin transportierten Oligonukleotiden, die zu einem spezifischen Effekt von 80 % im Vergleich zu einer scrambled-Sequenz führten.

Die Reduktion des Zielproteins wurde durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt.

Die Ergebnisse zeigen eine verbesserte Aufnahme der Oligonukleotide durch die Trägersysteme (2- bis 18-fach) im Vergleich zu freien Oligonukleotiden. Protamin-basierende Nanopartikel haben im Gegensatz zu den anderen Trägersystemen nur einen sehr geringen zytotoxischen Effekt. Lipofectin war mit einem spezifischen Antisense-Effekt von ungefähr 80 % im funktionalen Assay und circa 60 % im Western Blot das effektivste Trägersystem.

Das im Zuge der Zusammenarbeit mit Herrn Dirk Lochmann neu entwickelte peptidbasierte Drug-Delivery-System (Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel) stellt eine neue und konkurrenzfähige Möglichkeit des Transports von Oligonukleotiden in Zellen dar.

Aus der Zusammenarbeit der Arbeitskreise von Herrn Prof. Dr. Dieter Schubert (Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität) und unseres Arbeitskreises (AK Prof. Dr. Andreas Zimmer) zwei weitere Publikationen hervorgegangen. Diese Arbeiten sollen im Folgenden vorgestellt werden:

2.10 Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: preparation, physical properties and intracellular distribution

Vitali Vogel, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Gottfried Mayer, Christos Tziatzios, Jacomina A. van den Broek, Winfried Haase, Daan Wouters, Ulrich S. Schubert, Jörg Kreuter*, Andreas Zimmer, Dieter Schubert

(*Corresponding author)

Journal of Controlled Release , submitted (2004)

2.10.1 Eigenanteil

- Herstellung der für die Untersuchung der Zellaufnahme verwendeten fluoreszenzmarkierten Nanopartikel
- Untersuchung der Zellaufnahme an Maus-Fibroblasten mittels Konfokaler Laser Scan-Mikroskopie (CLSM)
- Auswertung und Diskussion insbesondere der eigenen Ergebnisse

2.10.2 Zusammenfassung der Publikation

Vogel et al. beschreiben in dieser Arbeit die Herstellung, physikalische Charakterisierung und die intrazelluläre Prozessierung von Oligonukleotid-Protamin-Oligonukleotid Nanopartikeln.

Verschiedene Herstellungsverfahren für die Nanopartikel werden beschrieben, wobei zur homogenen Herstellungsweise der Nanopartikel eine Spritzenpumpe bei der Zugabe von Lösungen eingeführt wurde. Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Größenbestimmung der Partikel mittels Analytischer-Ultrazentrifugation (AUZ). Die erhaltenen Befunde wurden durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) und Raster-Kraft-Mikroskopie (atomic force microscopy, AFM) bestätigt. Der Gehalt an humanem Serum-Albumin (HSA) in den Nanopartikeln wurde mittels UV-Spektroskopie (Derivative Spektroskopie) bestimmt. Die Zellaufnahme wurde anhand von Versuchen mit Maus-Fibroblasten *in vitro* untersucht. Hierzu wurden

fluoreszenzmarkierte Phosphorothioat-Oligonukleotide in die Nanopartikel eingebunden und die Verteilung nach Aufnahme in die Zellen mittels konfokaler Laser Scan-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM) untersucht. Mit diesem „ternären“ Partikelsystem, bestehend aus den drei Komponenten Phosphorothioat-Oligonukleotiden (PTO), Protamin und HSA, konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von HSA zu einem „binären“ Gemisch aus Protamin und Oligonukleotiden eine erhöhte Stabilität in salzhaltigen Lösungen erzielt wird. Die resultierenden Nanopartikel weisen einen Durchmesser von etwa 200 nm auf und werden gut von Maus-Fibroblasten aufgenommen. Die inkorporierten phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotide werden intrazellulär freigegeben.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden, dass diese Partikel eine positive Weiterentwicklung der Protamin-Oligonukleotide darstellen.

2.11 Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: protamine sulfate causes drastic size reduction

Gottfried Mayer, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Jacomina A. van den Broek, Christos Tziatzios, Winfried Haase, Daan Wouters, Ulrich S. Schubert, Andreas Zimmer, Jörg Kreuter*, Dieter Schubert

(*Corresponding author)

in preparation

2.11.1 Eigenanteil

- Herstellung der für die Untersuchung der Zellaufnahme verwendeten fluoreszenzmarkierten Nanopartikel
- Untersuchung der Zellaufnahme an Maus-Fibroblasten mittels Konfokaler Laser Scan-Mikroskopie (CLSM)
- Auswertung und Diskussion insbesondere der eigenen Ergebnisse

2.11.2 Zusammenfassung der Publikation

Ausgehend von Vogel et al. beschreiben Mayer et al. den Einfluss des Einsatzes von Protaminsulfat anstelle der freien Protaminbase auf das Self Assembly von Oligonuklotid-Protamin-Albumin Nanopartikeln.

Zur Untersuchung wurden wiederum die Methoden der Analytischen Ultrazentrifugation, der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) und der Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM) eingesetzt. Auch diese Nanopartikel wurden in einem Maus-Fibroblasten Zellmodell bezüglich der Zellaufnahme charakterisiert.

Hierbei wurde interessanterweise eine drastische Reduktion des mittleren Durchmessers von etwa 200 nm (Nanopartikel hergestellt mit Protamin freie Base) auf etwa 40 nm (Nanopartikel hergestellt mit Protaminsulfat) beschrieben. Auch bei diesen Partikeln konnte eine Aufnahme und intrazelluläre Verteilung in Maus-Fibroblasten gezeigt werden.

Beide Arbeiten zeigen, dass Oligonukleotid-Protamin-Albumin Nanopartikel ein potentiell Drug Delivery System für die Wirkstoffklasse der Phosphorothioat-Oligonukleotide darstellen.

3. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Arzneistoffformulierungen, wie kationische Nanopartikel, Liposomen und virale Hüllkapside, für den Transport von Antisense-Oligonukleotiden in Zellen zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der *in vitro* Testung in der Zellkultur. Als Zielstruktur wurde der NMDA-Rezeptor gewählt, dessen Expression durch die Gabe von Antisense-Oligonukleotiden gehemmt wurde. Testobjekt waren Fibroblasten aus der Maus, die in einer Vorgängerarbeit von Ralf Steinmetz mit der cDNA für die entsprechenden NMDA-Rezeptorsubtypen transfiziert worden sind und deren Eignung für die Testung von Rezeptorantagonisten schon gezeigt worden ist. Beim NMDA-Rezeptor handelt es sich um einen ligandgesteuerten Ionenkanal, der normalerweise nur in neuronalem Gewebe zu finden ist. Eine Überexpression und anschließende Stimulation des Rezeptors führt über einen massiven Ca^{2+} -Einstrom zum Absterben der Zellen. Dieses Modell erlaubte die Auswertung der Antisense-Wirkung in einem funktionellen Assay über ein reduziertes Absterbeverhalten der Zellen. Die spezifischen Reduktion des Zielproteins wurde mittels Western-Blot-Technik gezeigt.

Zu Beginn der Arbeit wurden die notwendigen Techniken, wie z.B. eine Methode zum Western-Blotting mittels Tankblotter, in Zusammenarbeit mit Frau Anke Rohmann etabliert **(2.1 Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2})**.

Es wurden vier verschiedenen *in vitro* Zytotoxizitäts-Modellen (LDH-, MTT-, Neutralrot- und ATP-Biolumineszenz-Assay) eingeführt und die zellschädigenden Wirkung von drei verschiedenen Modellschubstanzen (Triton X, Chloroquin und Natriumazid) im Vergleich zur Überexpression und Stimulation von NMDA-Rezeptoren im Zellmodell untersucht **(2.2 Comparison of cytotoxicity assays)**. Anhand dieser Ergebnisse wurden der MTT-Assay als geeignete Methode für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Zur Quantifizierung von Protamin als eines der zentralen Bausteine der Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dirk Lochmann eine neue Methode entwickelt, die über eine Kopplungsreaktion die fluorimetrische Bestimmung erlaubt **(2.3 New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent)**.

Der Stand der Forschung und Technik im Bereich der Drug-Delivery-Systeme für Oligonukleotide basierend auf rekombinanthergestellten viralen Hüllproteinen wurde in einem Übersichtsartikel dargestellt, der zusammen mit Frau Christiane Georgens erarbeitet wurde **(2.4 Recombinant virus like particles as Drug Delivery System)**.

Alle eingesetzten Trägersysteme wurden hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften untersucht. Im Mittelpunkt standen dabei die Bestimmung von Größe und Oberflächenladung (Zetapotential), die mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Methode wurden mit der relativ neuen Technik der Fluoreszenz-Correlations-Spektroskopie (FCS) verglichen. PBCA-Nanopartikel dienten hierbei als Modellpartikel. FCS-Messung sind nur mit fluoreszierenden Partikeln möglich; aus diesem Grund wurden zwei neue Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von PBCA-Nanopartikeln entwickelt. Zum einen wurde durch den Einbau von fluoreszenzmarkiertem Dextran in die Partikelmatrix der gesamte Partikel markiert und zum anderen war es auch möglich, nachträglich über eine Kopplungsreaktion mit den auf der Oberfläche vorhandenen Hydroxylfunktionen ein Fluorophor anzubringen. Zusätzlich konnte mit dieser Methode die Molekulare Masse der Nanopartikel bestimmt werden **(2.5 Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylate-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy)**.

Der Schwerpunkt bei der Untersuchung der Drug-Delivery-Systeme lag jedoch auf den biodegradierbaren Nanopartikeln auf Basis von Protamin. Daher wurde auch diese Partikelklasse intensiv in Zusammenarbeit mit Herrn Dirk Lochmann physiko-chemisch untersucht **(2.6 Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles)**.

Ausgehend von Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikeln, die auf eine Arbeit von Frau Monika Junghans zurückgehen, konnte gezeigt werden, dass sich diese durch den Zusatz von humanem Serumalbumin stabilisieren lassen. Durch Veränderung des Verhältnisses der Ausgangsstoffe zueinander lassen sich sowohl die Größe als auch die Oberflächenladung steuern **(2.7 Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation)**.

Im Anschluß an diese physikochemische Charakterisierung wurden diese Partikel in der Zellkultur im Vergleich zu freien, d.h. nicht an ein Trägersystem

gebundenen, und zu liposomal (DOTAP) verpackten Oligonukleotiden getestet. Es zeigt sich, dass die Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Formulierung gegenüber den freien Oligonukleotiden eine um den Faktor 12 verbesserte zelluläre Aufnahme aufweisen, was mit der liposomen Formulierung vergleichbar ist. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass 100 % der Zellen transfiziert worden sind. Es wurde sowohl im funktionellen Modell über Zelltod, als auch auf Proteinebene (Western-Blot) eine Reduktion des NMDA-Rezeptors von etwa 35 % 24 Stunden nach der Gabe des Oligonukleotids gefunden. Dieses Ergebnis spricht für eine intrazelluläre Freigabe der Oligonukleotide aus den Partikeln. Im Gegensatz zur liposomalen Zubereitung wurden keine zytotoxischen Nebenwirkungen der Nanopartikel gefunden **(2.8 Albumin-Protamine-Oligonucleotide-Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect)**.

In einem abschließenden Vergleich wurden rekombinant hergestellte virale Hüllkapside (VP1 Kapside), zwei kationische liposomale Zubereitungen (DOTAP/Lipofectin), zwei kationische Alkylcyanoacrylat Nanopartikelpräparationen (PBCA/PHCA) und zwei auf Protamin basierende Nanopartikelsysteme (mit/ohne Albumin-Zusatz) in der Zellkultur getestet. Untersucht wurde die Transfereffizienz für Oligonukleotide mittels einer Fluoreszenzmethode, die intrazelluläre Verteilung wurde im konfokalen Laser-Scan-Mikroskop dargestellt, es wurde eine Antisense-Wirkung im Vergleich zu einer Kontrollsequenz bestimmt (sowohl im funktionellen System, als auch im Western-Blot) und es wurden die zytotoxischen Nebenwirkungen betrachtet.

Zusammenfassend ergaben diese Ergebnisse eine um das 2- bis 18-fache Erhöhung der Zellaufnahme im Vergleich zu freien Oligonukleotiden. Die protamin-basierten Nanopartikel zeigten keine nennenswerten zytotoxischen Nebenwirkungen. Die beste Wirkung wurde von Lipofectin-Liposomen gezeigt, die eine Reduktion des NMDA-Rezeptors um mehr als 50 % im funktionellen Modell und von mehr als 60 % im Western-Blot zeigten **(2.9 Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems)**.

Das im Zuge der Zusammenarbeit mit Herrn Dirk Lochmann neu entwickelte peptidbasierte Drug-Delivery-System (Albumin-Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel) stellt eine neue und konkurrenzfähige Möglichkeit des Transports von Oligonukleotiden in Zellen dar.

4. Literaturverzeichnis

- Adams, S. L., Foldes, R. L. and Kamboj, R. K. (1995). "Human N-methyl-D-aspartate receptor modulatory subunit hNR3: cloning and sequencing of the cDNA and primary structure of the protein." *Biochim Biophys Acta* 1260(1): 105-8.
- Altman, S. (1993). "RNA enzyme-directed gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 10898-900.
- Ashcroft, F. M. (2000). *Ion Channels and Disease - channelopathies*. San Diego, California, USA, Academic Press.
- Berg, J., Tymoczko, J. and Stryer, L. (2003). *Biochemie*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Bertling, W. M., Gareis, M., Paspaleeva, V., Zimmer, A., Kreuter, J., Nurnberg, E. and Harrer, P. (1991). "Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers." *Biotechnol Appl Biochem* 13(3): 390-405.
- Berton, M., Turelli, P., Trono, D., Stein, C. A., Allemann, E. and Gurny, R. (2001). "Inhibition of HIV-1 in cell culture by oligonucleotide-loaded nanoparticles." *Pharm Res* 18(8): 1096-101.
- Bessho, Y., Nawa, H. and Nakanishi, S. (1994). "Selective up-regulation of an NMDA receptor subunit mRNA in cultured cerebellar granule cells by K(+)-induced depolarization and NMDA treatment." *Neuron* 12(1): 87-95.
- Borenfreund, E., Babich, H. and Martin-Alguacil, N. (1988). "Comparison of two in vitro cytotoxicity assay - The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests." *Toxic. In Vitro* 2(1): 1-6.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985). "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption." *Toxicol Lett* 24(2-3): 119-24.
- Bourguignon, J. P., Gerard, A., Purnelle, G., Czajkowski, V., Yamanaka, C., Lemaitre, M., Rigo, J. M., Moonen, G. and Franchimont, P. (1997). "Duality of glutamatergic and GABAergic control of pulsatile GnRH secretion by rat hypothalamic explants: I. Effects of antisense oligodeoxynucleotides using

- explants including or excluding the preoptic area." *J Neuroendocrinol* 9(3): 183-91.
- Branch, A. D. (1998). "A good antisense molecule is hard to find." *Trends Biochem Sci* 23(2): 45-50.
- Braun, H., Boller, K., Lower, J., Bertling, W. M. and Zimmer, A. (1999). "Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*." *Biotechnol Appl Biochem* 29 (Pt 1): 31-43.
- Budker, V. G., Knorre, D. G. and Vlassov, V. V. (1992). "Cell membranes as barriers for antisense constructions." *Antisense Res Dev* 2(2): 177-84.
- Burger, A. and Wachter, H. (1998). *Hunnis - Pharmazeutisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter & Co, Berlin.
- Caplen, N. J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A. and Morgan, R. A. (2001). "Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9742-7.
- Cech, T. R. (1989). "RNA as an enzyme." *Biochem Int* 18(1): 7-14.
- Cech, T. R. (1993). "Catalytic RNA: structure and mechanism." *Biochem Soc Trans* 21(2): 229-34.
- Coester, C. J., Langer, K., van Briesen, H. and Kreuter, J. (2000). "Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake." *J Microencapsul* 17(2): 187-93.
- Cook, J. A. and Mitchell, J. B. (1989). "Viability measurements in mammalian cell systems." *Anal Biochem* 179(1): 1-7.
- Crooke, S. T. (1999). "Molecular mechanisms of action of antisense drugs." *Biochim Biophys Acta* 1489(1): 31-44.
- Crouch, S. (2000). "Biocompatibility testing ATP bioluminescence." *Med Device Technol* 11(8): 12-15.
- Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. and Fletcher, J. (1993). "The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity." *J Immunol Methods* 160(1): 81-8.

- de Waele, C., Abitbol, M., Chat, M., Menini, C., Mallet, J. and Vidal, P. P. (1994). "Distribution of glutamatergic receptors and GAD mRNA-containing neurons in the vestibular nuclei of normal and hemilabyrinthectomized rats." *Eur J Neurosci* 6(4): 565-76.
- Dean, C., Hermes, C. A., Robinson, J. and Seagard, J. L. (1998). "Modulation of arterial baroreflexes by antisense oligodeoxynucleotides to NMDAR1 receptors in the nucleus tractus solitarius." *J Auton Nerv Syst* 74(2-3): 109-15.
- Dean, N. M. and Bennett, C. F. (2003). "Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer." *Oncogene* 22(56): 9087-96.
- Decker, T. and Lohmann-Matthes, M. L. (1988). "A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity." *J Immunol Methods* 115(1): 61-9.
- DeRenzis, F. A. and Schechtman, A. (1973). "Staining by neutral red and trypan blue in sequence for assaying vital and nonvital cultured cells." *Stain Technol* 48(3): 135-6.
- Dinauer, N., Lochmann, D., Demirhan, I., Zimmer, A., Chandra, A., Kreuter, J. and Briesen von, H. (2004). "Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transfection."
- Dingermann, T. (1999). *Gentechnik Biotechnik*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411(6836): 494-8.
- Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990). "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature* 346(6287): 818-22.
- Estibeiro, P. and Godfray, J. (2001). "Antisense as a neuroscience tool and therapeutic agent." *Trends Neurosci* 24(11 Suppl): S56-62.

- Felt, O., Buri, P. and Gurny, R. (1998). "Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery." *Drug Dev Ind Pharm* 24(11): 979-93.
- Ferber, M. J. and Maher, L. J., 3rd (1997). "Quantitating oligonucleotide affinities for duplex DNA: footprinting vs electrophoretic mobility shift assays." *Anal Biochem* 244(2): 312-20.
- Gannon, R. L. and Rea, M. A. (1994). "In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle." *Brain Res Mol Brain Res* 23(4): 338-44.
- Garry, M. G., Malik, S., Yu, J., Davis, M. A. and Yang, J. (2000). "Knock down of spinal NMDA receptors reduces NMDA and formalin evoked behaviors in rat." *Neuroreport* 11(1): 49-55.
- Godbey, W. T., Wu, K. K. and Mikos, A. G. (1999). "Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery." *J Control Release* 60(2-3): 149-60.
- Hartmann, G., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Hacker, U. and Endres, S. (1998). "Antisense-Oligonukleotide: Nukleinsäuren zur gezielten Synthesehemmung krankheitsfördernder Proteine." *Deutsches Ärzteblatt* 95: 1524-30.
- Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000). "Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells." *J Immunol* 164(2): 944-53.
- Henke, S., Rohmann, A., Bertling, W. M., Dinger, T. and Zimmer, A. (2000). "Enhanced in vitro oligonucleotide and plasmid DNA transport by VP1 virus-like particles." *Pharm Res* 17(9): 1062-70.
- Hermann, T. and Patel, D. J. (2000). "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers." *Science* 287(5454): 820-5.
- Hess, S. D., Daggett, L. P., Crona, J., Deal, C., Lu, C. C., Urrutia, A., Chavez-Noriega, L., Ellis, S. B., Johnson, E. C. and Velicelebi, G. (1996). "Cloning and functional characterization of human heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 278(2): 808-16.

- Hess, S. D., Daggett, L. P., Deal, C., Lu, C. C., Johnson, E. C. and Velicelebi, G. (1998). "Functional characterization of human N-methyl-D-aspartate subtype 1A/2D receptors." *J Neurochem* 70(3): 1269-79.
- Hope, M. J., Mui, B., Ansell, S. and Ahkong, Q. F. (1998). "Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs (review)." *Mol Membr Biol* 15(1): 1-14.
- Ikeda, K., Nagasawa, M., Mori, H., Araki, K., Sakimura, K., Watanabe, M., Inoue, Y. and Mishina, M. (1992). "Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel." *FEBS Lett* 313(1): 34-8.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M. and et al. (1993). "Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits." *J Biol Chem* 268(4): 2836-43.
- Johnson, J. W. and Ascher, P. (1987). "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons." *Nature* 325(6104): 529-31.
- Junghans, M., Kreuter, J. and Zimmer, A. (2000). "Antisense delivery using protamine-oligonucleotide particles." *Nucleic Acids Res* 28(10): E45.
- Junghans, M., Kreuter, J. and Zimmer, A. (2001). "Phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotide condensation and preparation of antisense nanoparticles." *Biochim Biophys Acta* 1544(1-2): 177-88.
- Karp, S. J., Masu, M., Eki, T., Ozawa, K. and Nakanishi, S. (1993). "Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor." *J Biol Chem* 268(5): 3728-33.
- Kerkmann, M., Rothenfusser, S., Hornung, V., Towarowski, A., Wagner, M., Sarris, A., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. (2003). "Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* 170(9): 4465-74.
- Kleckner, N. W. and Dingledine, R. (1988). "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." *Science* 241(4867): 835-7.

- Kolhekar, R., Murphy, S. and Gebhart, G. F. (1997). "Thalamic NMDA receptors modulate inflammation-produced hyperalgesia in the rat." *Pain* 71(1): 31-40.
- Korzeniewski, C. and Callewaert, D. M. (1983). "An enzyme-release assay for natural cytotoxicity." *J Immunol Methods* 64(3): 313-20.
- Kreuter, J. (1983). "Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. I: Preparation Methods." *Pharm Acta Helv* 58(9-10): 196-209.
- Kreutz, M. R., Bockers, T. M., Bockmann, J., Seidenbecher, C. I., Kracht, B., Vorwerk, C. K., Weise, J. and Sabel, B. A. (1998). "Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival." *J Neurosci* 18(20): 8278-91.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and Klinman, D. M. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* 374(6522): 546-9.
- Kurreck, J. (2003). "Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications." *Eur J Biochem* 270(8): 1628-44.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. and et al. (1992). "Molecular diversity of the NMDA receptor channel." *Nature* 358(6381): 36-41.
- Lai, S. K., Wong, C. K., Yang, M. S. and Yung, K. K. (2000). "Changes in expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the rat neostriatum after a single dose of antisense oligonucleotide specific for N-methyl-D-aspartate receptor 1 subunit." *Neuroscience* 98(3): 493-500.
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H. and Schubert, D. (2003). "Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles." *Int J Pharm* 257(1-2): 169-80.
- Lappalainen, K., Jaaskelainen, I., Syrjanen, K., Urtti, A. and Syrjanen, S. (1994). "Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes." *Pharm Res* 11(8): 1127-31.

- Le Bourdelles, B., Wafford, K. A., Kemp, J. A., Marshall, G., Bain, C., Wilcox, A. S., Sikela, J. M. and Whiting, P. J. (1994). "Cloning, functional coexpression, and pharmacological characterisation of human cDNAs encoding NMDA receptor NR1 and NR2A subunits." *J Neurochem* 62(6): 2091-8.
- Lebedeva, I., Benimetskaya, L., Stein, C. A. and Vilenchik, M. (2000). "Cellular delivery of antisense oligonucleotides." *Eur J Pharm Biopharm* 50(1): 101-19.
- Lebedeva, I. and Stein, C. A. (2001). "Antisense oligonucleotides: promise and reality." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 403-19.
- Levin, A. A. (1999). "A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides." *Biochim Biophys Acta* 1489(1): 69-84.
- Lin, Y. J., Bovetto, S., Carver, J. M. and Giordano, T. (1996). "Cloning of the cDNA for the human NMDA receptor NR2C subunit and its expression in the central nervous system and periphery." *Brain Res Mol Brain Res* 43(1-2): 57-64.
- Mandich, P., Schito, A. M., Bellone, E., Antonacci, R., Finelli, P., Rocchi, M. and Ajmar, F. (1994). "Mapping of the human NMDAR2B receptor subunit gene (GRIN2B) to chromosome 12p12." *Genomics* 22(1): 216-8.
- Matthies, H., Schroder, H., Wagner, M., Holtt, V. and Krug, M. (1995). "NMDA/R1-antisense oligonucleotide influences the early stage of long-term potentiation in the CA1-region of rat hippocampus." *Neurosci Lett* 202(1-2): 113-6.
- Meguro, H., Mori, H., Araki, K., Kushiya, E., Kutsuwada, T., Yamazaki, M., Kumanishi, T., Arakawa, M., Sakimura, K. and Mishina, M. (1992). "Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs." *Nature* 357(6373): 70-4.
- Minton, K. W. (1985). "The triple helix: a potential mechanism for gene regulation." *J Exp Pathol* 2(3): 135-48.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. and Seeburg, P. H. (1992). "Heteromeric

- NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes." *Science* 256(5060): 1217-21.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1991). "Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor." *Nature* 354(6348): 31-7.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Müller, R. H. and Hildebrand, G. E. (1998). *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. and Schäfer-Korting, M. (2001). *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Nachlas, M. M., Margulies, S. I., Goldberg, J. D. and Seligman, A. M. (1960). "The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt." *Anal Biochem* 1: 317-26.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A. and Prochiantz, A. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." *Nature* 307(5950): 462-5.
- Osborne, S. E., Matsumura, I. and Ellington, A. D. (1997). "Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects." *Curr Opin Chem Biol* 1(1): 5-9.
- Pirollo, K. F., Rait, A., Sleer, L. S. and Chang, E. H. (2003). "Antisense therapeutics: from theory to clinical practice." *Pharmacol Ther* 99(1): 55-77.
- Pizzi, M., Boroni, F., Bianchetti, K. M., Memo, M. and Spano, P. (1999). "Reversal of glutamate excitotoxicity by activation of PKC-associated metabotropic glutamate receptors in cerebellar granule cells relies on NR2C subunit expression." *Eur J Neurosci* 11(7): 2489-96.
- Planells-Cases, R., Sun, W., Ferrer-Montiel, A. V. and Montal, M. (1993). "Molecular cloning, functional expression, and pharmacological

- characterization of an N-methyl-D-aspartate receptor subunit from human brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11): 5057-61.
- Pschyrembel, W. (1998). *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter.
- Roberts, E. B., Meredith, M. A. and Ramoa, A. S. (1998). "Suppression of NMDA receptor function using antisense DNA block ocular dominance plasticity while preserving visual responses." *J Neurophysiol* 80(3): 1021-32.
- Rosenmund, C., Stern-Bach, Y. and Stevens, C. F. (1998). "The tetrameric structure of a glutamate receptor channel." *Science* 280(5369): 1596-9.
- Rothenfusser, S., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Endres, S. and Hartmann, G. (2001). "CpG-Oligonukleotide: Immuntherapie nach dem Muster bakterieller DNA." *Deutsches Ärzteblatt* 15: 981-985.
- Rydh-Rinder, M., Berge, O. G. and Hokfelt, T. (2001). "Antinociceptive effects after intrathecal administration of phosphodiester-, 2'-O-allyl-, and C-5-propyne-modified antisense oligodeoxynucleotides targeting the NMDAR1 subunit in mouse." *Brain* 86(1-2): 23-33.
- Slater, K. (2001). "Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery." *Curr Opin Biotechnol* 12(1): 70-4.
- Smith, F. E. (1951). "Tetrazolium Salt." *Science* 113: 751-754.
- Soltesz, I., Zhou, Z., Smith, G. M. and Mody, I. (1994). "Rapid turnover rate of the hippocampal synaptic NMDA-R1 receptor subunits." *Neurosci Lett* 181(1-2): 5-8.
- Standaert, D. G., Testa, C. M., Rudolf, G. D. and Hollingsworth, Z. R. (1996). "Inhibition of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunit expression by antisense oligonucleotides reveals their role in striatal motor regulation." *J Pharmacol Exp Ther* 276(1): 342-52.
- Stark, H., Grassmann, S. and Reichert, U. (2000a). "[Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors. 1. Architecture and modulation of receptors]." *Pharm Unserer Zeit* 29(3): 159-66.

- Stark, H., Reichert, U. and Grassmann, S. (2000b). "[Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors. 2. Therapy concepts and new receptor ligands]." *Pharm Unserer Zeit* 29(4): 228-36.
- Stein, C. A. (1996). "Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity." *Trends Biotechnol* 14(5): 147-9.
- Steinmetz, R. D. (2000). Functional Expression of Recombinant N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Receptors in Eucaryotic Cell Lines. Faculty of Biochemistry, Pharmacy and Food Chemistry. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-University: 178.
- Stephenson, M. L. and Zamecnik, P. C. (1978). "Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1): 285-8.
- Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G. and Lipton, S. A. (1995). "Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain." *J Neurosci* 15(10): 6509-20.
- Takano, H., Onodera, O., Tanaka, H., Mori, H., Sakimura, K., Hori, T., Kobayashi, H., Mishina, M. and Tsuji, S. (1993). "Chromosomal localization of the epsilon 1, epsilon 3 and zeta 1 subunit genes of the human NMDA receptor channel." *Biochem Biophys Res Commun* 197(2): 922-6.
- Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G. and Tsien, J. Z. (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." *Nature* 401(6748): 63-9.
- Tuerk, C. and Gold, L. (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." *Science* 249(4968): 505-10.
- Vickers, T. A., Koo, S., Bennett, C. F., Crooke, S. T., Dean, N. M. and Baker, B. F. (2003). "Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis." *J Biol Chem* 278(9): 7108-18.
- Vuyisich, M. and Beal, P. A. (2002). "Controlling protein activity with ligand-regulated RNA aptamers." *Chem Biol* 9(8): 907-13.

- Wahlestedt, C., Golanov, E., Yamamoto, S., Yee, F., Ericson, H., Yoo, H., Inturrisi, C. E. and Reis, D. J. (1993). "Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions." *Nature* 363(6426): 260-3.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. (1953). "The structure of DNA." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18: 123-31.
- Williams, M., Kowaluk, E. A. and Arneric, S. P. (1999). "Emerging molecular approaches to pain therapy." *J Med Chem* 42(9): 1481-500.
- Yamazaki, M., Mori, H., Araki, K., Mori, K. J. and Mishina, M. (1992). "Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit." *FEBS Lett* 300(1): 39-45.
- Zamecnik, P. C. and Stephenson, M. L. (1978). "Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1): 280-4.
- Zapata, A., Capdevila, J. L., Tarrason, G., Adan, J., Martinez, J. M., Piulats, J. and Trullas, R. (1997). "Effects of NMDA-R1 antisense oligodeoxynucleotide administration: behavioral and radioligand binding studies." *Brain Res* 745(1-2): 114-20.
- Zelphati, O., Degols, G., Loughrey, H., Leserman, L., Pompon, A., Puech, F., Maggio, A. F., Imbach, J. L. and Gosselin, G. (1993). "Inhibition of HIV-1 replication in cultured cells with phosphorylated dideoxyuridine derivatives encapsulated in immunoliposomes." *Antiviral Res* 21(3): 181-95.
- Zelphati, O. and Szoka, F. C., Jr. (1996). "Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids." *Pharm Res* 13(9): 1367-72.
- Zelphati, O., Uyechi, L. S., Barron, L. G. and Szoka, F. C., Jr. (1998). "Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells." *Biochim Biophys Acta* 1390(2): 119-33.
- Zhang, W. W. and Roth, J. A. (1994). "Anti-oncogene and tumor suppressor gene therapy--examples from a lung cancer animal model." *In Vivo* 8(5): 755-69.

- Zhong, J., Gribkoff, V. K. and Molinoff, P. B. (1996). "Use of subunit-specific antisense oligodeoxynucleotides to define developmental changes in the properties of N-methyl-D-aspartate receptors." *Mol Pharmacol* 50(3): 631-8.
- Zhou, X. and Huang, L. (1994). "DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action." *Biochim Biophys Acta* 1189(2): 195-203.
- Zhu, H. and Ho, I. K. (1998). "NMDA-R1 antisense oligonucleotide attenuates withdrawal signs from morphine." *Eur J Pharmacol* 352(2-3): 151-6.
- Zimmer, A., Aziz, S. A., Gilbert, M., Werner, D. and Noe, C. R. (1999). "Synthesis of cholesterol modified cationic lipids for liposomal drug delivery of antisense oligonucleotides." *Eur J Pharm Biopharm* 47(2): 175-8.
- Zobel, H. P., Junghans, M., Maienschein, V., Werner, D., Gilbert, M., Zimmermann, H., Noe, C., Kreuter, J. and Zimmer, A. (2000). "Enhanced antisense efficacy of oligonucleotides adsorbed to monomethylaminoethylmethacrylate methylmethacrylate copolymer nanoparticles." *Eur J Pharm Biopharm* 49(3): 203-10.
- Zobel, H. P., Kreuter, J., Werner, D., Noe, C. R., Kumel, G. and Zimmer, A. (1997). "Cationic polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for antisense oligonucleotides." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(5): 483-93.

5. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 30. September 1973
 Geburtsort: Xanten
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet



Schule

1980 - 1984 Gemeinschaftsgrundschule Xanten
 1984 - 1990 Walter-Bader-Realschule Xanten
 1990 - 1993 Städtisches Stiftsgymnasium Xanten
 1993 Abitur

Studium

10/1993 - 03/1994 Mathematik/Physik an der Universität/Gesamthochschule
 Duisburg
 04/1994 - 09/1999 Pharmazie an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-
 Universität Bonn

Praktisches Jahr

12/1999 - 05/2000 Aventis Pharma Frankfurt
 in der Abteilung Drug Delivery Liquid Development
 06/2000 - 11/2000 Bahnhof-Apotheke in Frankfurt/Höchst
 01/2001 Approbation als Apotheker

Promotion

04.01 – 03.04 Stipendiat des Graduiertenkollegs GK 137/3 der Deutschen
Forschungsgemeinschaft am Institut für Pharmazeutische
Technologie der JOHANN WOLFGANG GOETHE-
UNIVERSITÄT, Frankfurt
Anfertigung der Dissertation

Akademische Lehrer

K.-W. Glombitza, U. Holzgrabe, J. Lehmann, E. Leistner, P. Nickel, K. Mohr,
K.-J. Steffens, R. Süverkrüp, B. Wiedemann, A. Zimmer

Publikationen

Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A.; Testung von Antisense-Oligonukleotid-Formulierungen am Beispiel des NMDA-Rezeptors; Sci. Pharm. 71 (1) (2003), S91

Lochmann D., Weyermann J., Dinauer N., von Briesen H., Zimmer A.; Antisense Therapie gegen das HI-Virus mittels Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel; Sci. Pharm. 71 (1) (2003), S85

Rohmann, A., Lochmann, D., Weyermann, J., Bertling, W.M., Dinger, Th., Zimmer, A.; Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2}; Oligonucleotides, 1 (2004), p. 1-9

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Christiane Georgens, Isam Rais, Jörg Kreuter, Michael Karas, Markus Wolkenhauer, Andreas Zimmer; Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy; European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 58 (1) (2004), p. 25-35

Dirk Lochmann, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Norbert Dinauer, Hagen von Briesen, Jörg Kreuter, Dieter Schubert, Andreas Zimmer; Physicochemical Characterisation of Protamine - Phosphorothioate Nanoparticles; Journal of Microencapsulation; in press (2004)

Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Christiane Georgens, Ruth Prassl, Andreas Zimmer; Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation; European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, in press (2004)

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Christiane Georgens, Andreas Zimmer; Albumin-Protamine-Oligonucleotide-Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect; European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, in press (2004)

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer; Comparison of cytotoxicity assays; International Journal of Pharmaceutics; in press (2004)

Dirk Lochmann, Sylvia Stadlhofer, Jörg Weyermann, Andreas Zimmer; New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent; International Journal of Pharmaceutics; 283 (1-2) (2004), p. 11-17

Jörg Weyermann, Dirk Lochmann and Andreas Zimmer; Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems; Journal of Controlled Release; 100 (3) (2004), p. 411-423

Christiane Georgens, Jörg Weyermann and Andreas Zimmer; Recombinant virus like particles as Drug Delivery System; review; Current Pharmaceutical Biotechnology, in press (2004)

Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Muller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Muller WE, Eckert A.; Amyloid- β -induced Changes in Nitric Oxide Production and Mitochondrial Activity Lead to Apoptosis; J Biol Chem., 279 (48) (2004), p. 50310-50320

Vitali Vogel, Dirk Lochmann, Jörg Weyermann, Christos Tziatzios, Jacomina A. van den Broek, Winfried Haase, Daan Wouters, Ulrich S. Schubert, Andreas Zimmer, Jörg Kreuter, Dieter Schubert; Oligonukleotide-protamine-albumin nanoparticles: preparation, physical properties and intracellular distribution; in press (2004)

Gottfried Mayer, Vitali Vogel, Jörg Weyermann, Dirk Lochmann, Jacomina A. van den Broek, Christos Tziatzios, Winfried Haase, Daan Wouters, Ulrich S. Schubert, Andreas Zimmer, Jörg Kreuter, Dieter Schubert; Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: protamine sulfate causes drastic size reduction; in preparation

Vorträge und Konferenzteilnahmen

„Der NMDA-Rezeptor als Modellbeispiel für Antisense-Oligonukleotid-Formulierungen (I)“; Vortrag am Institut für pharmazeutische Chemie und Technologie, Graz (September 2001)

„Arzneistoffformulierung von Antisense-Oligonukleotiden gegen NMDA-Rezeptorexpression“; Vortrag im Rahmen des Graduiertenkollegs, Frankfurt (Oktober 2001)

„Der NMDA-Rezeptor als Modellbeispiel für Antisense-Oligonukleotid-Formulierungen (II)“; Vortrag im Rahmen des Graduiertenkollegs, Rheingau (Januar 2002)

„N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors as a screening model for Antisense-Oligonukleotide Drug-Delivery-systems“; Poster beim „4th European Graduate Student Meeting“ der DPhG/EUFEPS, Frankfurt (Februar 2002)

Teilnahme am „4th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology“ der APV, Florenz (April 2002)

“N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors: Approach for the testing of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems“; Poster beim CRS-DAY 2002, Wien (Mai 2002)

“N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors: A well characterised test model for antisense-Oligonucleotide drug-delivery-systems“; Poster beim „10th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy“, Antibes Juan-les-Pins (Oktober 2002)

„Der NMDA-Rezeptor als Modellbeispiel für Antisense-Oligonukleotid-Formulierungen (III)“; Vortrag beim Forschungsseminar des Instituts für pharmazeutische Technologie, Frankfurt (Dezember 2002)

„Zytotoxische Effekte am Beispiel des NMDA-Rezeptors“; Vortrag im Rahmen des Graduiertenkollegs, Rheingau (Januar 2003)

„Testung von Antisense-Oligonukleotid-Formulierungen am Beispiel des NMDA-Rezeptors“; Poster bei der XVII. Wissenschaftliche Tagung der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft, Graz (April 2003)

„Antisense Therapie gegen das HI-Virus mittels Protamin-Oligonukleotid-Nanopartikel“; Poster bei der XVII. Wissenschaftliche Tagung der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft, Graz (April 2003)

„Antisense-Oligonukleotide Drug-Delivery-systems against N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor expression“; Poster beim „30th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society“, Glasgow (Juli 2003)

„Enhanced cellular uptake of Oligonukleotides and siRNA using protamine-based-nanoparticles“; Poster beim „30th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society“, Glasgow (Juli 2003)

„Physicochemical Characterisation of Oligonukleotide loaded Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles using Fluorescence Correlation Spectroscopy“; Poster bei der „RNA – Structure, Function and Ligand Interaction Conference“, Frankfurt (Oktober 2003)

„Biopolymere Trägersysteme für RNA-Liganden“; Poster für die Begutachtung des SFB 579, Frankfurt (März 2004)

„Peptide-based-nanoparticles: a promising approach towards antisense delivery“; Poster beim „International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology“ der APV, Nürnberg (März 2004)

„Characterisation of cationic Polybutylcyanoacrylate-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy”; Poster beim „International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology” der APV, Nürnberg (März 2004)

Anhang

Veröffentlichte Originalarbeiten

- 2.1 Rapid screening method for antisense oligonucleotides against human growth factor receptor p185^{erbB-2}
- 2.2 Comparison of cytotoxicity assays
- 2.3 New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde / N-acetyl-L-cysteine reagent
- 2.4 Recombinant virus like particles as Drug Delivery System
- 2.5 Physicochemical characterisation of Cationic Polybutylcyanoacrylat-Nanoparticles by Fluorescence Correlation Spectroscopy
- 2.6 Physicochemical Characterisation of Protamine-Phosphorothioate Nanoparticles
- 2.7 Albumin-Protamine-Oligonucleotide Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 1, Physicochemical characterisation
- 2.8 Albumin-Protamine-Oligonucleotide-Nanoparticles as a new antisense delivery system: Part 2, Cellular uptake and effect
- 2.9 Comparison of Antisense-Oligonucleotide Drug-Delivery-systems
- 2.10 Oligonukleotide–protamine–albumin nanoparticles: preparation, physical properties and intracellular distribution
- 2.11 Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: protamine sulfate causes drastic size reduction

Aus urheberrechtlichen Gründen sind die der Disseratation zugrundeliegenden Arbeiten in der veröffentlichten Version der Dissertationsschrift nicht enthalten.